

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Betrachtung der metabolischen Funktion
von Hepatozyten in einem dynamischen
Kultursystem**

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Andreas Grünwald
aus Stuttgart

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. P. Neuhaus
 2. Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Hetzer
 3. PD Dr. med. H. H. Schauwecker

Datum der Promotion: 17. Januar 2005

Abstract Deutsch

Die Arbeit befasst sich mit Methoden der Erfassung metabolischer Funktion einer dynamischen Zellkultur in Bioreaktoren zur klinischen Verwendung als Leberunterstützungssystem. Der Fokus liegt auf der Etablierung von Tests zur Qualitätssicherung als effiziente In- Prozess Kontrollen während der Bereitstellungsphase der Zellkulturen. Weitere Ziele sind ein Beitrag zu Wirksamkeitsnachweis und zur Charakterisierung des Systems im Rahmen von Zulassungen als "Biologic".

Bei der experimentellen Untersuchung unter Verwendung von Leberzellkulturen aus porcinen Organen wurden der Lidocain- MEGX Test, die Elimination von Galaktose und Sorbitol sowie die Elimination von Ammoniak und die Synthese von Harnstoff, Lactat und Albumin berücksichtigt. Dies erfolgte mittels Bolus- und Fließgleichgewichtsuntersuchungen sowie Konzentrationsbestimmungen.

Die Ergebnisse zeigten für alle Parameter einen hochsignifikanten Unterschied zu Zellfreien Bioreaktoren, sowie einen typischen Verlauf, der in eine initiale Adhäsionsphase, eine stabile Kulturphase und eine darauf folgende erweiterte Phase mit langsamer Abschwächung der Zelleistungen gegliedert werden kann.

Die Parameter erwiesen sich prinzipiell alle geeignet für den Einsatz in der Qualitätssicherung der dynamischen Zellkultur. Ein kombiniertes Untersuchungsschema bestehend aus Parametern die die Integrität der Zellmembranen reflektieren, wie die Freisetzung von Enzymen, sowie metabolischen Parametern wie Lidocain, Galaktose, Sorbitol als auch Syntheseparameter, für Proteine Albumin, als Hepatozyten typische Leistungen die Synthese von Harnstoff und der Abbau von Lactat ist in der Lage einen ausreichend umfassenden Einblick in den Status der dynamischen Zellkultur zu liefern.

Schlagworte: Leberunterstützung, Zellkultur, Metabolismus, Bioreaktor, Lidocain, Megx, Sorbitol, Galaktose

Abstract English

Objectives of this work were to find easy to handle every day quality assessment procedure for bioreactors that are intended for clinical trials, further more usefulness of these parameters in characterization and standardization of the Liver Support System.

Parameters for evaluation had been: Lidocaine, Megx, Sorbitol, Galactose, Urea, Albumin and Lactate. Bolus and Continuous metabolic liver functions tests had been done, for synthesis and detoxification parameters liberation was measured by concentration.

Highly significant difference between bioreactor with primary porcine liver cells and cell-free devices was shown by t-tests. Differences to other groups like infected bioreactors had been demonstrated with ANOVA. Results show typical course over the culture period that can be categorized into a initial phase of cell reorganization, a stable culture phase and an extended phase with slow decay. All parameter proved to be suitable for daily routine quality assessment in dynamic cell culture systems. The combination of parameters reflecting different specific cellular function is able to give more comprehensive insights in the status of the cell culture.

Keywords: Liver Support, Cell- Culture, Metabolism, Bioreactor, Lidocaine, Megx, Sorbitol, Galactose

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Zellkulturmodelle	10
1.1.1	Statische Zellkulturen	10
1.1.2	Dynamische Zellkulturen	12
1.2	Möglichkeiten der Bewertung der Zellfunktion	13
1.2.1	Morphologisches Erscheinungsbild	13
1.3	Biochemische Untersuchungen - Integrität der Plasmamembran	14
1.4	Metabolische Untersuchungen	15
1.4.1	Grundlagen der Leberfunktionsteste (LFT) in vivo	16
1.4.2	Lidocain und MEGX	18
1.4.3	Galaktose	19
1.4.4	Sorbitol	20
1.4.5	Antipyrin	21
1.5	Syntheseparameter	21
1.5.1	Ammoniak und Harnstoffsynthese	21
1.5.2	Aminosäurenstoffwechsel	22
1.5.3	Albumin	22
1.5.4	Lactat	23
1.5.5	Gluconeogenese	23
1.6	Ziele der eigenen Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Das dynamische Kulturmodell	25
2.1.1	Bioreaktor	25
2.1.2	Bioreaktormonitor	26
2.1.3	Systemaufbau	27
2.1.4	Betriebsmodi des Bioreaktor- Systems	27
2.1.5	Stand-By Protokoll	28
2.2	Zellisolierung	30
2.2.1	Tieroperation	30
2.2.2	Zellisolierungs- Prozess	31
2.2.3	Zellaufbereitung und -einfüllung	32
2.2.4	Adhäsionsphase	33
2.3	Viabilitätsuntersuchungen und Analytik	34
2.3.1	Bolus Leberfunktionstests	34
2.3.2	Kontinuierliche Leberfunktionstests	35

2.3.3	Lidocain	35
2.3.4	MEGX	36
2.3.5	Galaktose	36
2.3.6	Sorbitol	36
2.3.7	Albumin	36
2.4	Statistik	36
2.4.1	Statistische Prüfung von Unterschieden zwischen Mittelwerten	37
2.4.2	Graphen	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Metabolische Untersuchungen – Bolus LFTs	39
3.1.1	Lidocain	39
3.1.2	MEGX	40
3.1.3	Sorbitol	41
3.1.4	Galactose	42
3.1.5	Ammoniak	43
3.2	Metabolische Untersuchungen – Kontinuierlicher LFT	45
3.2.1	Lidocain	45
3.2.2	MEGX	46
3.2.3	Sorbitol	47
3.2.4	Galaktose	48
3.3	Syntheseparameter	50
3.3.1	Pig-Albumin	50
3.3.2	Ammoniak Basal	51
3.3.3	Harnstoff	52
3.3.4	Lactat	53
3.4	Kinetik der Testsubstanzen im zellfreien Bioreaktorsystem	55
3.4.1	Lidocain	55
3.4.2	MEGX	55
3.4.3	Sorbitol	56
3.4.4	Galaktose	56
3.4.5	Ammoniak	57
4	Diskussion	59
4.1	Metabolische Untersuchungen	59
4.1.1	Lidocain	59
4.1.2	MEGX	60
4.1.3	Sorbitol	61

4.1.4	Galaktose	62
4.1.5	Ammoniak	62
4.2	Syntheseparameter	64
4.2.1	Albumin	64
4.2.2	Ammoniak Basal und Harnstoff	64
4.2.3	Lactat	64
4.3	Gesamtbewertung der Zellkulturen	64
4.4	Ausblick	66
5	Zusammenfassung	68

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ABT	Aminopyrine Breath Test; Aminopyrin- Atemtest
ALT	Alanin- Aminotransferase
ANOVA	Analysis of Variance; Analyse der Varianz
AS	Aminosäure(n)
AST	Aspartat- Aminotransferase
BE	Base Excess Basenüberschuß
Ca+	Kalcium- Kation
Cl-	Chlor-Anion
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ELIZA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
FPIA	Fluoreszenzpolarisations- Immunoassays
G0 Phase	Gap 0 Phase
G1 Phase	Gap 1 Phase
G2 Phase	Gap 2 Phase
GAL	Galaktose
GEC	Galactose Elimination Capacity; Galaktose Eliminations Kapazität
GEK	Galaktose Eliminations Kapazität
GLDH	Glutamat- Dehydrogenase
GST	Glutathione-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HEPES	N-2Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulphon-Säure
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HPLC	hochleistungs Flüssigkeits-Chromatographie
I.E.	internationale Einheiten
K+	Kalium- Kation
LDH	Lactat- Dehydrogenase
LFT	Leberfunktionstest
LID	Lidocain

LSS	liver support system (Leberunterstützungssystem)
LUS	Leberunterstützungssystem
M	Mean, Mittelwert
m	Meter
M Phase	Mitose Phase
MEGX	Monoethylglycinoxylid
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilber
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MW	Molekulargewicht
N	Normalen
Na ⁺	Natrium-Kation
PBS	phosphat-gepufferte Salzlösung
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PERV	Porcines Endogenes Retrovirus
PES	Polyethersulfon
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PVC	Polyvinylchlorid
QA	Quality Assessment – Beurteilung der Qualität
S Phase	Synthesis Phase
SAP	systolischer arterieller Druck
SD	Standard Deviation; Standardabweichung
SDH	Sorbitol Dehydrogenase
sec	Sekunde
SORB	Sorbitol
SPF	specific pathogen free
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TIVA	totale intravenöse Anästhesie
V.	Vena
γ- GT	γ- Glutamyl- Transpeptidase

1 Einleitung

1.1 Zellkulturmodelle

Das Kultivieren von primären Zellen außerhalb ihrer physiologischen Umgebung, dem Organ und dem lebenden Organismus als Ganzes, erfordert die Bereitstellung von einer nachempfundenen künstlichen Lebensumgebung, die der Situation in vivo so nahe wie möglich kommt. Basale Bedürfnisse der Zellen, beispielsweise die Deckung des Energiebedarf, der Aufrechterhaltung des Membranpotentials und der Temperatur sind- zumindest für einen bestimmten Zeitraum bereits für viele Zellarten mit dem relativ einfachen Mittel der Kulturschale zu erreichen. Die Kulturschale als statische Zellkultur unterliegt aber vielen Beschränkungen, deshalb wurden verschiedene andere Kulturmodelle entwickelt. Die dynamische Zellkultur hat den Vorteil der kontinuierlichen, steuerbaren Zufuhr von Kulturmedium und Gas. Eine dynamische Zellkultur hat das meiste Potential für die Entwicklung eines hybriden Leberunterstützungssystem (LUS), das dieser Arbeit zugrunde liegt. Die Möglichkeit, der Perfusion der Zellkultur mit humanem, durch eine vorgeschaltete Plasmaseparation gewonnenen Plasma, statt mit Kulturmedium macht einen klinischen Einsatz als Leberunterstützungstherapie möglich.

1.1.1 Statische Zellkulturen

Zellkulturen von primären Leberzellen wurden als Technik zur einfacheren Analyse der Leberfunktion entwickelt. Die ersten Hepatozytenkultursysteme bestanden nur aus isolierten Leberzellen, die in Kulturschalen mit Serum oder wegen der besseren Reproduzierbarkeit und Ausgangssituation für viele Experimente, bald darauf mit definiertem Medium überschichtet wurden. In Suspensionskulturen, wo die Hepatozyten keine Möglichkeit zur Reorganisation oder Adhäsion haben, kommt es bereits nach wenigen Stunden zum Verlust der Zellfunktion. Der Nutzen dieser einfachen Kultursysteme ist auf kurze Zeit begrenzt, morphologische und funktionelle Änderungen der Zellen treten bereits während der ersten Tage in Kultur auf^{1 2}. Der Verlust der spezifischen Funktion der Hepatozyten in einer so einfachen Kulturumgebung deutet auf das Fehlen von Faktoren hin, die in vivo vorhanden sind und die hepatozelluläre Funktion unterstützen. Zahlreiche Wissenschaftler haben sich dieser Fragestellung angenommen und versucht, die Kulturverhältnisse der in vivo Situation näher zu bringen.

Dazu gehörte zuerst die Verbesserung des Mediums durch Zugabe von einer Vielzahl von Substraten³, und der Zugabe von Hormonen wie Insulin^{4 5} oder Glukokortikoide^{6 7 8}. Durch diese Mediumzusätze konnte die Funktion der Zellen auf 1 bis 2 Wochen verlängert werden und bestimmte Effekte wie die Steigerung der Albumin Synthese erreicht werden.

Um die Zellkultur noch länger in Funktion und Differenzierung zu halten wurde die Methode der Anheftung der Zellen an eine Oberfläche ähnlich dem Bindegewebe entwickelt. Geeigneter als Kunststoff erwiesen sich Adhäsionsflächen organischer Herkunft, wie Typ I Kollagen⁹. Kollagen verbessert die initiale Adhäsionsfähigkeit und verlängert die Funktion der Zellen in den Bereich von Wochen. Dadurch wurde es zum ersten Mal möglich, Cytochrom P450 durch Phenobarbital in kultivierten Zellen zu induzieren¹⁰. Durch die Verbesserung der organischen Adhäsionsfläche in eine komplexe Biomatrix, bestehend aus aufbereiteten Kollagen Fasern und sauren Proteinen wie Fibronektin und kleine Mengen an Glycosaminoglykanen gelang es Hepatozyten von Ratten über 5 Monate zu kultivieren¹¹. Der Nutzen von einer komplexen extrazellulären Matrix für die parenchymalen Zellen zeigte sich sehr deutlich.

Für die interzelluläre Kommunikation via Gap- Junctions ist das Vorhandensein der Extrazellulären Matrixkomponenten Glycosaminoglykane und Proteoglykane vor allem entscheidend. Die Korrelation der Menge an mRNA die für Gap- Junction Protein kodiert (bestimmt mit Northern Blots) und der Menge an 27-kD Gap Junction Polypeptid (bestimmt mit Western Blots) mit dem Grad der Elektrischen- und intracellulärer Farbstoff Kopplung zeigt, dass aktive Glycosaminoglykane und Proteoglykane die Expression und Synthese von Gap- Junctions induziert¹².

Ein weiterer Schritt in Richtung physiologische Umgebung war das Bereitstellen von Zellen des Bindegewebes als Co- Kultur^{13 14 15 16}, die Zell- Zell- Kontakte ermöglichten. In herkömmlicher Kultur verlieren die Hepatozyten rasch die für sie typischen Gap- Junctions¹², mit Co- Kultur halten die Gap- Junctions unbegrenzt. Ein weiteres wichtiges Funktionsmerkmal, die für parenchymale Zellen übliche kubischen Form wird durch die Co- Kultur erhalten¹⁷. Gap- Junctions können auch

durch verschiedene Medienzusätze wie Hyaluronate länger erhalten werden¹⁸, jedoch nur im Bereich von Tagen, die Effizienz der Co- Kultur wird dabei bei weitem nicht erreicht.

Durch Co- Kultur lassen sich wichtige Mechanismen der zellulären Kommunikation erhalten. Zu diesen Mechanismen gehört

- 1) direkter Kontakt durch Tight- Junctions und Desmosomen
- 2) elektrische und mechanische Kopplung
- 3) extrazelluläre Matrix wie z.B. Basalmembran und Grundsubstanz
- 4) sekretorische Signale; Autokrin, Parakrin und Endokrin.

Die einzelnen Leistungen der Zellen sind zum Teil einzigartig für eine Zellreihe wie viele metabolische Funktionen von Hepatozyten, andere Leistungen wie die Kollagensynthese und Sekretion finden in parenchymalen und nicht- parenchymalen Zellen statt wie Hepatozyten und Sinusendothelzellen¹⁹.

Mittels Zeitraffer- Mikroskopie ist es möglich, die Migration, Mitose- und Abstoßungs- Verhalten einer Zellart oder einer Co- Kultur über ein bestimmtes Zeitintervall zu messen²⁰.

Die räumlichen Ordnung der Zelle hat einen großen Einfluß auf ihre Funktion^{21 22 23}. Der beste Weg, nach A. Guillouzo²⁴ diese Funktion zu erhalten scheint die Benutzung von Matrigel²⁵ in der Sandwich Technik zu sein. Die Sandwich Technik, bei der die Leberzellen auf eine Schicht Kollagen aufgebracht werden und dann mit einer weiteren Schicht bedeckt werden hat gegenüber der einfachen Kollagen Schicht mehrere Vorteile, wie die Vermeidung von physikalischen Scherkräften beim Mediumwechsel und wesentlich längere Beibehaltung differenzierter Funktionen^{26 27}. Objektiviert ausgedrückt mittels des Anteils der Albumin Transkriptions-Aktivität: für frisch isolierte Zellen war die Transkriptions- Aktivität verglichen mit intakten Leberzellen bei 40%, im einfachen Kollagen Schicht System bei 5% an Tag 7, im Sandwich Schicht System bei 40% zwischen Tag 7 und Tag 21²⁸.

Andere erfolgreiche Modelle der Kultivierung von Hepatozyten beruhen auf Enzyminduktion. Dimethylsulfoxid (DMSO) scheint den Effekt von beidem durch pharmakologische Induktion von Differenzierung zu simulieren²⁹. Die Albumin Sekretion ist bei diesem Modell bei 35% und bleibt stabil, Gen Expression für Hepatozyten spezifische Funktionen ist auf hohem Niveau erhalten³⁰.

Der Zusatz von Hepatocyte Growth Factor (HGF) reguliert die Expression von Cytochrom P450 Isoenzymen in der Zellkultur herunter³¹, Cytochrom als Phase I Enzyme werden beeinflusst, jedoch nicht Phase II Enzyme wie UDP- Glucuronyltransferase oder Glutathione-S-Transferase (GST). Die Suppression verringert auch stark die Effekte der Enzyminduktion durch Substrate an den Cytochrom P450 Isoenzymen³². Auf der anderen Seite bewirkt HGF die Stimulation der Zellen in die Mitose einzutreten. Nach 96 Stunden Inkubation mit HGF steigt die Anzahl der Hepatozyten die den G0/G1 Status verlassen und in die S und G2 sowie M Phasen eintreten³³.

Der Einfluss von Kohlendioxid und Sauerstoffgehalt in der Begasung der Zellkulturen auf den Energiestoffwechsel ist ebenfalls bedeutsam³⁴ und sollte den physiologischen Bedingungen so nahe wie möglich kommen..

Landry et al³⁵ beschreibt Techniken, Leberzellkulturen zu räumlichen, gewebeähnlichen Aggregaten zu reorganisieren. Dabei ist die Oberfläche poly-HEMA (poly-2-hydroxyethyl methacrylate) beschichtet, so dass die verwendeten postnatalen Rattenleberzellen abgewiesen werden und statt an der Oberfläche zu aggregieren sich in Sphäroide organisieren. In derselben Studie wird auch semiquantitativ auf den Einfluss von Glucocorticoiden und Glucagon bezug genommen, da der Anteil der Parenchymalen zu Nicht- Parenchymalen Zellen sich bei Mangel an diesen Hormonen zugunsten der Nicht- Parenchymalen Zellen verschiebt.

Seit wenigen Jahren ist auch die gezielte Erforschung der räumlichen Konfiguration von Co- Kulturen durch Mikrofabrikations- Techniken³⁶, beruhend auf photolithographische Verfahren, möglich.

Die statische Zellkultur hat ihre Anwendung vor allem bei wissenschaftlichen Fragestellungen wie Pharmakologischen Untersuchungen oder bei der Aufklärung von Stoffwechselwegen sowie zunehmend zur Synthese von Proteinen und Antikörpern. Das Verfahren der Wahl zur Zellkultur ist

von der Fragestellung der geplanten Studie abhängig, Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren sind- soweit bekannt- abzuwägen³⁷, pathologische und physiologische Effekte in vitro sind zu differenzieren.

Die definierten Bedingungen der Kulturmethoden für viele Zelltypen beinhalten eine Reihe von löslichen Regulatoren und Substrate von definierten Matrixkomponenten die durch den Zelltyp und den zu regulierenden physiologischen Prozess bestimmt werden³⁸ und der Anpassung bedürfen.

Ein Nachteil der statischen Schalenkultur ist die geringe Substratmenge, die von der kleinen Zellmenge bewältigt werden kann.

1.1.2 Dynamische Zellkulturen

Die Technik der isoliert perfundierten Leber ist schon seit langem in Gebrauch. Dabei wird die Leber, vor allem Rattenleber, kanüliert und in einer Perfusionapparatur verbracht, wo sie dann mit Vollblut durchströmt wird. Die wohl ausgereifteste und komplexeste Perfusionsapparatur, die viele Aspekte der in vivo Situation der Leber berücksichtigt, ist die von Neuhaus^{39 40 41}, die Schweinelebern verwendet und zur temporären Therapie des Leberversagens gedacht ist. Die hauptsächlichsten Vorteile der isoliert perfundierten Leber sind die erhaltene Organstruktur und die Möglichkeit den Gallenfluss separat zu sammeln und zu analysieren⁴¹. Die Dauer der Nutzung ist aber wegen Hämodynamik und Immunokompatibilität auf kurze Zeit begrenzt. Die klinische Anwendung als Leberunterstützung war jedoch bei den meisten Autoren wenig erfolg versprechend⁴² oder eher zum kurzfristigen Bridging vor Transplantationen geeignet.

Um die Vorteile der Organperfusion und die Vorteile der statischen Kulturen zu verbinden beziehungsweise zumindest zu einem großen Teil zu vereinen wurden hybride Zellkultursysteme entwickelt, die sowohl aus künstlichen Materialien wie auch aus biologischen Komponenten bestehen. Die hybriden dynamischen Leberzellkulturen wurden vor allem mit dem Ziel der Leberunterstützung bei Patienten konzipiert. Laut Arkadopoulos⁴³ wurden schon seit den Fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts Leberunterstützungssysteme konstruiert, welche isolierte oder gezüchtete Leberzellen und Leberscheiben in verschiedenen Bioreaktoren perfundierten. Der wohl erste Versuch auf diesem Gebiet war von Nose et al⁴⁴ in den 60er Jahren. Sie füllten eine kryokonservierte Hasen-Leberzellsuspension in einen Dialysator, der mit Cellulose Membranen ausgestattet war, die für Moleküle mittlerer Größe durchlässig waren. Das System eines modifizierten Dialysators haben viele Arbeitsgruppen beibehalten, darunter Mikami und Matsumura. Der Ansatz von Brunner et al⁴⁵ bestand aus zellulären Komponenten und immobilisierten Leberenzymen, dieser Ansatz leistete aber nur Detoxifikation, komplexe Regulationsmechanismen und Syntheseleistung stehen dabei außen vor. Ein auf Leberscheiben basierendes Gerät entwarf Soyer et al⁴⁶, Eiseman et al⁴⁷ experimentierte mit isolierten Hepatocyten in verschiedenen Geräten, darunter eine Zentrifuge, einem Dialysator und einer Perfusionskammer. Basierend auf vielen parallel geschalteten Monolayerkulturen entwickelte Uchino et al⁴⁸ ein Gerät, welches aber nie seinen Weg in die klinische Erprobung fand.

Als Zellquelle dienten den meisten Wissenschaftlern primäre xenogene Hepatocyten oder Hepatom-Zelllinien. Primäre Humanhepatozyten, die bei Split-Liver-Transplantationen oder nicht zur Transplantation geeigneten Organen anfallen stehen nur gelegentlich und begrenzt zur Verfügung. Hepatomzelllinien bereiten Schwierigkeiten im Hinblick auf die Biologische Sicherheit, insbesondere bei immunsupprimierten Patienten nach der Lebertransplantation. Außerdem scheint die hepatocytenspezifischen Funktionen nur teilweise erhalten zu sein. Sussman et al⁴⁹ konstruierte als erster ein hybrides Leberunterstützungssystem mit C3A Zellen, Abkömmlinge einer Hepatoblastomzelllinie. In einer randomisierten klinischen Studie⁵⁰ des King's College Hospital, London, UK, wurde bei der Überlebensrate in der Therapie des akuten Leberversagens fast kein Unterschied zwischen intensivierter konventioneller Intensivtherapie und Leberunterstützungstherapie mit dem Gerät von Sussman festgestellt. Versuche mit Hepatoma Zellen der HepG2 Zelllinie ergaben außerdem eine verkürzte Lebensdauer der Zellen unter Toxinbelastung, ein erhöhten Glukose Verbrauch verbunden mit gesteigerter Laktat Bildung, geringere Urea Synthese, geringere Protein Synthese sowie ein nicht induzierbares Cytochrom P450 System⁵¹. In der gleichen Studie von Stange et al wurden neben HepG2 Zellen auch immortalisierte Hepatozyten von Transgenen Mäusen und primäre Hepatozyten von Ratten verglichen. Die immortalisierten Zellen hatten ebenfalls einen erhöhten Verbrauch von Glucose und eine gesteigerte Produktion von Laktat, sowie eine mittelmäßige Harnstoffsynthese und die P450 Induktion war bei weitem nicht so effektiv wie in primären Zellen, die in allen gemessenen

Bereichen die besten Ergebnisse zeigten.

Die Isolation von großen Mengen Leberzellen wurde kontinuierlich verbessert. Es ist auch möglich, einzelne Zellarten für bestimmte Fragestellungen zu gewinnen⁵².

Xenogene primäre Zellquellen, vor allem von Schweinen sind von den meisten Arbeitsgruppen bevorzugt. Sie sind wegen ihren bemerkenswerten morphologischen und funktionellen Homologien mit humanen Leberzellen beliebt. Die Biokompatibilität ist allerdings noch nicht völlig geklärt.

Obwohl die Zellen in dem von Gerlach konstruierten Bioreaktor⁵³ -der dieser Arbeit zugrunde liegt- in separaten, durch Membranen abgeschirmten Kompartimenten residieren und von besonderen SPF- Tieren stammen ist die im Zusammenhang mit der Xenotransplantation geführte Diskussion über Xenoinfektionen^{54 55 56 57}, insbesondere die Entwicklungen über den Porcinen Endogenen Retrovirus (PERV)^{58 59} zu beachten. Der von Gerlach konstruierte Bioreaktor⁶⁰ erlaubt durch seine Bauweise dezentralisierten Stoffaustausch, separate Gasversorgung über spezielle Oxygenierungsmembranen sowie verschiedene Betriebsmodi. Eine Tierexperimentelle Erprobung als hybrides Leberunterstützungssystem fand bereits erfolgreich statt⁶¹. Auch eine klinische Erprobung mit 8 Patienten erfolgte bereits, eine xenogene PERV Infektion konnte nicht nachgewiesen werden⁶². Für die weitere Entwicklung und Nutzung von xenogenen Zellen ist ein Modell zur Testung der Immunbarriere mittels präparierten Lymphozyten mit Hepatozyten in Alginate Beads beschrieben⁶³.

Dynamische Zellkulturen in Bioreaktoren mit drei Dimensionaler Co- Kultur eignen sich auch- in Labor Skalierung- zu Pharmazeutischen Untersuchungen in vitro. Durch Methylcholanthren Induktion konnte die Aktivität der 7-Ethoxyresofurin O-deethylase um das 20 fache gesteigert werden, sowie weitere Funktionen auf hohem Niveau nachgewiesen werden⁶⁴.

1.2 Möglichkeiten der Bewertung der Zellfunktion

Die Kriterien zur Bewertung der Viabilität von Zellen in Kultur lassen sich in drei systematische Kategorien einteilen⁶⁵: (1) Morphologisches Erscheinungsbild, (2) Integrität der Plasmamembran und (3) funktionelle Kapazität. Einheitliche Standards haben sich für die Evaluation von Leberzellkulturen noch nicht herausgebildet. Um eine möglichst umfassende Aussage treffen zu können ist der Einsatz von mehreren Tests, die unterschiedliche Bereiche der Zellviabilität abdecken, wünschenswert. Viele Techniken aus dem Bereich der Gewebe- und Organ Viabilitätstests sind mit Zellkulturen nicht brauchbar⁶⁶, andere wie z.B. Mikroskopie sind geeignet.

1.2.1 Morphologisches Erscheinungsbild

Eine einfache und effektive Methode ist die Lichtmikroskopie, mit oder auch ohne Färbung. Mit der Durchstrahlelektronenmikroskopie (TEM) und der Rasterelektronenmikroskopie (SEM) kann die interne Struktur der Zelle und die räumliche Zellorganisation dargestellt werden. Während die Lichtmikroskopie schnell und einfach durchzuführen ist kommt die Elektronenmikroskopie für die Routine der Zellevaluation wegen des Aufwands nicht in Frage. Ergebnisse einer Studie liegen für den von Gerlach entwickelten Bioreaktor bereits vor^{67 68 69}, weitere systematische Arbeit ist im Gange.

Die morphologische Bewertung ist jedoch bei Zellkulturen in Bioreaktoren nur vor der Zelleinfüllung und nach Versuchsende, wenn der Bioreaktor geöffnet werden kann, möglich. Biopsien, die eine repräsentative Gewebe- Probe liefern sind aus Gründen der besonderen Konstruktion und wegen der Notwendigkeit der Erhaltung der keimfreien Umgebung während der Kulturphase gegenwärtig fast nicht realisierbar. Deshalb eignet sich die Mikroskopie nicht als Routine Parameter in der täglichen Qualitätssicherung der Leberzellkultur für den klinischen Einsatz.

1.2.1.1 Lichtmikroskopie

Mit dem Lichtmikroskop sieht man wie viele Zellen einzeln, manche als Doublet oder in Aggregaten vorliegen. Die Phasenkontrastmikroskopie ist wesentlich besser geeignet um die Zellen zu bewerten. Unzerstörte Hepatozyten sind oval oder kugelförmig, haben einen Helligkeitskontrast zwischen Zellkern und Zytoplasma und einen Refraktionsbedingten Ring um die Zellmembran. Bei geschädigten Hepatocyten muss man zwischen irreversiblen und reversiblen Schäden

unterscheiden. Herman et al.⁷⁰ unterscheidet drei Stufen der Schädigung. Die erste Stufe ist charakterisiert durch zahlreiche schmale Blasen, in der zweiten Stufe konfluieren die schmalen Blasen und bilden eine oder mehrere größere Blasen, die sich aus der Zellmembran stülpen. In der dritten Stufe verschwinden die Blasen, die Plasmamembran wird diskontinuierlich und ein genereller Einstrom in die Zelle findet statt. Im Phasenkontrast zeigen sich Zellen der Schädigungsstufe drei hochgranulär, der Kontrast zwischen Medium und Zellen sowie zwischen Zellkern und Zellplasma geht verloren. Während Stufe eins und zwei noch reversibel sind ist Stufe drei irreversibel. Bei gekühlten Hepatozyten findet sich oft eine generelle leichte Schwellung an Stelle der Blasenbildung.

Das morphologische Erscheinungsbild der Zellen vor der Einfüllung in den Bioreaktor ist ein wichtiges Kriterium. Nur eine Zellsuspension mit geringem Grad an Schädigung sollte ihren Weg in den Bioreaktor finden.

1.2.1.2 Trypan Blau

Der Standard zur Identifizierung defekter Zellen und seit langem gebräuchlich ist der organische Farbstoff Trypan Blau. In vielen Publikationen über primäre Zellkulturen wird er für die Angabe der initialen Viabilität nach der Isolierung der Zellen verwendet.

Der Test ermöglicht eine Aussage über die Aufrechterhaltung des negativen inneren Plasmamembranpotentials^{71 72}. Durch die negative Ladung von Trypan Blau kann der Farbstoff nur in die Zellen penetrieren wenn das aktiv aufrechterhaltene innere Membranpotential zusammengebrochen ist. Eine weiterführende Aussage über andere metabolischen Funktionen und die zu erwartende Qualität der Zellen lässt der Test nicht zu. Manche Autoren verknüpfen mit dem Trypan Blau Test auch die Integrität der Plasmamembran. Elektronenmikroskopische Aufnahmen beweisen aber, dass auch Zellen mit morphologisch intakter Plasmamembran Trypan Blau aufnehmen können, ein Indiz, dass das Membranpotential das wesentliche Kriterium ist. Man kann aber dennoch davon ausgehen, dass Zellen die Trypan Blau aufnehmen irreversibel geschädigt sind. Eine Schädigung von mehr als 10% der Zellen bei der initialen Prüfung mit Trypan Blau gibt Berry⁷³ als bedenkenswerte Grenze bei Hepatozyten von Ratten für die weitere Verwendung der Zellsuspension an. Dieses Kriterium sollte als Freigabekriterium für eine Zellsuspension gelten. Es wurde in dieser Form auch in die Routineprotokolle als In Prozess Kontrolle vor der Zelleinfüllung in den Bioreaktor integriert.

1.3 Biochemische Untersuchungen - Integrität der Plasmamembran

Enzymliberation

Im klinischen Alltag hat die Bestimmung der Enzyme im Serum einen wichtigen Stellenwert. Auch in der Zellkultur ist die Bestimmung der freigesetzten Enzyme wegen der etablierten und einfachen Tests ein sehr hilfreiches Werkzeug um Zellschäden und ihre Ausmaße zu beurteilen. Enzyme verlassen über physiologische Exportmechanismen die Zellen oder werden bei einem Zellschaden freigesetzt⁷⁴. Bei einem Zellschaden werden zuerst die Enzyme des Zytoplasma freigesetzt, dann die Mitochondrialen und als letztes die membrangebundenen Enzyme, damit kann man aus dem Enzymmuster auf die schwere des Schadens schließen.

In der klinischen Diagnostik verwendet man verschiedene Quotienten für eine enzymologische Differentialdiagnose von Lebererkrankungen durchzuführen. Der de Ritis- Quotient (AST/ALT) ist bei akuten Virushepatitiden typischerweise kleiner als 0,7. Für andere Erkrankungen sind typische Bereiche beschrieben.

Der Quotient dient klinisch der Abschätzung des Schweregrads der Einzelzellschädigung. Hohe Werte zeigen eine relativ geringe, kleine Werte dagegen eine tief greifende Zerstörung des Parenchyms der Leber an.

Der Quotient ist bei den meisten Erkrankungen zwischen 1 und 6, bei Metastasenlebern typischerweise über 20.

Die Verwendung der einzelnen Parameter der Enzymliberation in der täglichen Routine der Zellkultur wird in einer eigenständigen Arbeit dargestellt und ist ein wichtiger Beitrag zur laufenden Qualitätskontrolle und ein einfaches Mittel zur täglichen In-Prozess Kontrolle. Die Bedeutung der einzelnen Enzyme wird nachfolgend kurz skizziert:

AST

Die Messung der Aktivität der Aspartat- Aminotransferase erfolgt im zusammengesetzten optischen Test, bei dem L- Aspartat und α - Ketoglutarat durch die AST zu Oxalacetat und L- Glutamat umgesetzt werden. Im nächsten Schritt, einer Malat- Dehydrogenase katalysierten Indikatorreaktion reagieren Oxalacetat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu Malat und NAD^+ .

Die AST ist eine Zellständiges Enzym, das nur bei Zellschädigung freigesetzt wird, und bei fast allen Erkrankungen der Leber und der Gallenwege erhöht ist.

ALT

Die Bestimmung der Alanin- Aminotransferase erfolgt im zusammengesetzten optischen Test, bei dem L- Alanin und α - Ketoglutarat zu Pyruvat und L-Glutamat umgesetzt werden. In einer LDH Katalysierten Indikatorreaktion reagieren Pyruvat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu Laktat und NAD^+ .

Erhöhung der ALT- Aktivität sind klinisch ein Indiz für Schäden des Parenchyms der Leber mit Membranpermeabilitätsstörung.

GLDH

Die Glutamat- Dehydrogenase ist in den Hepatozyten ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert. Die GLDH Aktivität wird optisch gemessen, unter der katalytischen Wirkung der GLDH werden 2-Ketoglutarat und $\text{NADH} + \text{NH}_4^+$ zu L-Glutamat und NAD^+ umgesetzt.

GLDH wird bei schwerwiegenden Schäden des Parenchyms der Leber verstärkt freigesetzt.

LDH

Die Lactat- Dehydrogenase wird nach der Reaktion

$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Laktat} + \text{NAD}^+$

Photometrisch über die Abnahme der Extinktion des NADH quantitativ bestimmt.

Wegen des ubiquitären Vorkommens der LDH spielt dieses Enzym in der klinischen Leberdiagnostik keine besondere Rolle. Da die Enzyme in der Ko- Kultur der Zellen jedoch vorwiegend aus den Hepatozyten stammen ist die Lactat- Dehydrogenase zur Bestimmung von Zellschaden prinzipiell interessant.

γ -GT

Die γ - Glutamyl- Transpeptidase ist in den Epithelien der intrahepatischen Gallenwege in hoher Aktivität nachweisbar. Es katalysiert die Reaktion

$\gamma\text{-Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid} + \text{Glycylglycine} \rightarrow \gamma\text{-Glutamyl-glycylglycid} + 3\text{-Carboxy-4-nitroanilin}$

Die Enzymatische Reaktion wird durch kontinuierliche Messung der Extinktionszunahme bei 405 nm verfolgt. In der Klinik ist die γ -GT das Leitenzym für pathologische cholestatische Prozesse oder durch Enzyminduktion für Alkoholabusus.

1.4 Metabolische Untersuchungen

Die Testung der metabolischen Funktionen der Zellkultur hat einen wichtigen Stellenwert, da auf die klinisch etablierten Punkte Scores, die auf vor allem auf Anamnese und Befund basieren, nicht zurückgegriffen werden kann. Auch erfassen die quantitativen Leberfunktionstests physiologische Funktionen direkt, was die Chance für ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Prozesse gibt⁷⁵.

Das Profil für Tests für Dynamische Zellkulturen weicht durch die komplexe Massenverteilung in großem Maße von statischen Kulturen ab. Deshalb ist eine Orientierung an klinischen Leberfunktionstest (LFT) sinnvoll, die bei vielen Autoren bereits für die in vitro Leberperfusion herangezogen wurden. Die Eliminationskinetik der Testsubstanzen muss bekannt sein und um unabhängig von der Konzentration zu messen muss sie einer Kinetik erster Ordnung folgen. Außerdem gelten in Bezug auf die Sicherheit die gleichen Anforderungen wie in der klinischen

Verwendung, da die getesteten Reaktoren für die Therapie von Patienten im akuten Leberversagen genutzt werden sollten und somit der Sicherheit die höchste Priorität eingeräumt werden muss.

1.4.1 Grundlagen der Leberfunktionsteste (LFT) in vivo

Metabolische Leberfunktionsteste funktionieren auf der Basis der Bestimmung der Clearance. Dabei wird die eliminierte Stoffmenge pro Zeiteinheit durch die Blutkonzentration geteilt, man erhält so eine von der Konzentration unabhängige Aussage über die Aktivität eines Enzyms oder eines physiologischen Transport- Vorgangs.

Winkler et al ⁷⁶ haben die LFTs nach ihren Perfusions- Eliminations- Beziehung und der damit verbundenen diagnostischen Aussage kategorisiert. Sie teilen die Testsubstanzen nach ihren kinetischen Eliminations Konstanten (V_{\max} , K_m) und des hepatischen Blutflusses in drei Kategorien ein, das (1) Flussbegrenzte Schema, das (2) Generelle Schema und das (3) Enzymbegrenzte Schema. Die Grundlage der Schematisierung bildet die Voraussetzung des Zutreffens der Michaelis- Menten Gleichung bei den getesteten Enzymsystemen. Die Michaelis- Menten Gleichung beschreibt im Fließgleichgewicht den Zusammenhang der Reaktionsgeschwindigkeit und der Substratkonzentration mit zwei Parametern, der Enzymatischen Aktivität (V_{\max}) und der Affinitätskonstanten (K_m).

Die direkte Messung von V_{\max} durch hohe Konzentrationen der Testsubstanz, welche das Enzymsystem absättigt, ist wegen der durch die erforderliche hohe Konzentration zu Befürchtenden unerwünschter Effekte toxischer, osmotischer oder hämodynamischer Art nur mit den wenigsten Substanzen möglich. Die Clearance Bestimmung mit geringeren Konzentrationen kann aus der Michaelis- Menten Gleichung abgeleitet werden:

$$v = \frac{V_{\max} * c}{K_m + c} \quad [1]$$

v = Eliminationsgeschwindigkeit, c = Konzentration, V_{\max} und K_m kinetische Konstanten des Enzyms.

Wenn die Konzentration sehr gering ist ($c \ll K_m$) kann Formel [1] in

$$v = \frac{V_{\max} * c}{K_m} \quad [2]$$

oder durch umstellen in

$$\frac{v}{c} = \frac{V_{\max}}{K_m} \quad [2a]$$

umgewandelt werden. Der Ausdruck auf der linken Seite ist per Definition die Clearance, mit der Dimension Volumen / Zeit. Unter der Voraussetzung, K_m ist ein konstanter Parameter, der von den physiochemischen Eigenschaften des Enzyms bestimmt wird, zeigt die Formel [2a], dass die Clearance proportional zu V_{\max} ist. Wird in vivo eine Substanz als Bolus Injektion in einer Konzentration verabreicht, die so niedrig ist, dass der Abbau proportional zur Konzentration ist, so folgt nach einer initialen Verteilungsphase der Substanzabbau einer einfachen Exponentialfunktion (Funktion 1. Ordnung), von welcher die Clearance dann berechnet werden kann. Die Konzentration kann in vivo nicht unmittelbar homogen an den metabolisch aktiven Orten gemessen werden, was der komplexe Aufbau der Leber mit sich bringt. Praktisch messbar sind die Konzentrationen die in die Leber einfließen und die wieder aus der Leber herausfließen. Die Auflösung einer Differentialgleichung, die den Konzentrationsgradienten in der Leber beschreibt ergibt folgende Formel:

$$v = F * K_m * \ln \frac{C_{out}}{C_{in}} + V_{\max} \quad [3]$$

C_{out} = Konzentration nach der Leberpassage, C_{in} = Konzentration vor der Leberpassage, v =

Eliminationsgeschwindigkeit, F = hepatischer Blutfluss.

Die posthepatische Konzentration C_{out} ist bei einem Patienten nur mit größerem apparativem Aufwand (Katheterisierung der V. Hepatica) bestimmbar und bei kleinen Konzentrationen meist schwierig zu analysieren, aber nach dem Fickschen Prinzip

$$v = F(C_{in} - C_{out}) \quad [4a]$$

kann man C_{out} aus der Formel [3] herauslösen:

$$v = F * C_{in} * (1 - e^{-\frac{(V_{max} - v)}{F * K_m}}) \quad [4b]$$

Die Formel [4b] ist gültig für C_{in} von Null bis Unendlich. Sie bietet damit eine generelle Lösung, welche aber die Eliminationsrate in einer komplizierten Weise in Relation zur Konzentration der Testsubstanz setzt.

Von dieser generellen Lösung lässt sich mit bestimmten Beschränkungen ein generelles Clearance Schema ableiten. Wenn die Eliminationsrate v klein ist ($v/(F * K_m) \ll 1$, oder $v/V_{max} \ll 1$) lässt sich die Clearance einfacher ausdrücken:

$$\frac{v}{C_{in}} = F * (1 - e^{-\frac{V_{max}}{F * K_m}}) \quad [5] \text{ generelles Clearance Schema}$$

Diese Formel weicht von der Michaelis- Menten- Gleichung für kleine Konzentrationen, der Formel [2] durch die Implementierung des hepatischen Blutflusses ab. Die Abhängigkeit der Clearance vom hepatischen Fluss ist- wie bereits erwähnt- durch die Organarchitektur der Leber bedingt. Mit Substanzen des generellen Clearance Schemas kann man zwischen Leberperfusion und Leberfunktion nicht unterscheiden, um die Perfusion von der Funktion zu differenzieren bedarf es speziellen Clearance Schemen, für Flussbegrenzte Clearance und für Enzymbegrenzte Clearance, die sich vom generellen Clearance Schema durch die kinetischen Eigenschaften der Testsubstanzen ableiten.

Bei niedriger first- pass Elimination einer Substanz, wenn V_{max} einer gegebenen Substanz klein im Verhältnis zum Produkt von $F * K_m$ ist, dann kann die generelle Clearance Formel [5] zum Enzymbegrenzten Clearance Schema näherungsweise umgewandelt werden:

$$\frac{v}{C_{in}} = \frac{V_{max}}{K_m} \quad [6] \text{ Enzymbegrenztes Clearance Schema}$$

Diese Formel ist identisch mit der Gleichung [2a]. Die Enzymbegrenzte Clearance variiert nicht mit dem hepatischen Blutfluss, sie ist somit ein Test der metabolischen Funktion unabhängig von der Kinetik.

Wenn bei der ersten Leberpassage fast das gesamte Substrat metabolisiert wird, wenn also $V_{max}/(F * K_m) \gg 1$, dann kann das generelle Clearance Schema [5] zu

$$v = F * C_{in} \quad [7] \text{ Flussbegrenztes Clearance Schema}$$

reduziert werden. Das Flussbegrenzte Schema kann für die Bestimmung des hepatischen Blutflusses herangezogen werden, nicht jedoch für die Funktion, da K_m und V_{max} komplett aus der Gleichung verschwinden. Die Klassifizierung der Testsubstanzen hängt somit von der Kenntnis Ihrer Kinetik ab.

Im Bioreaktor ist die Kinetik unterschiedlich zur Leber in vivo. Statt Arterie, Portalvene und lobuläre Ultrastruktur und Vena Hepatica als ableitendes Gefäß gibt es einen rezirkulierenden Kreislauf, der kontinuierlich mit frischem Medium versorgt wird und in gleichem Maße altes Medium abfließt. Der Bioreaktor befindet sich im rezirkulierenden Kreislauf, innerhalb des Bioreaktors verteilt sich das Medium über verschiedene Kompartimente für Flüssigkeit, das Intrakapilläre- und das Zellkompartiment. Das Diffusionsverhalten ist abhängig von der Substanz, dem Molekulargewicht und der spezifischen Dichte. Die Kinetik einer Bolusgabe einer Substanz in eine dynamische Zellkultur kann weitgehend in zwei Phasen unterteilt werden, der initialen Distributions- Phase und

der darauf folgenden Eliminations- Phase⁷⁷.

1.4.2 Lidocain und MEGX

Lidocain wird als Medikament in der Therapie von Herzrhythmusstörungen und als Lokalanästhetikum weit verbreitet eingesetzt. Die Kinetik von Lidocain in vivo ist gut beschrieben⁷⁸, die therapeutische Breite ist gering, Nebenwirkungen, insbesondere unerwünschte Effekte auf das zentrale Nervensystem sind häufig. Die terminale Halbwertszeit in gesunden Personen liegt bei ca. 90 min, abhängig von Autor und Studienkollektiv.

Der hepatische Metabolismus von Medikamenten und Umweltgiften wird von zwei Klassen von Enzymen katalysiert: den Oxidoreduktasen und Hydrolasen sowie den Transaminasen. Die Reaktionen katalysiert von den Oxydoreduktasen und Hydrolasen wird als Phase I bezeichnet, die Synthesereaktionen katalysiert von den Transaminasen wird als Phase II Metabolismus bezeichnet. Die meisten Reaktionen finden an mehr als einem Typ dieser Phasen statt, ein Synergistischer Effekt ist die Regel. Phase I Reaktionen erhöhen die Polarität eines Moleküls, somit die Wasserlöslichkeit und damit die Fähigkeit des Organismus die Substanz auszuschcheiden. Gelegentlich entstehen dabei auch toxische Metaboliten. Die Produkte der Phase II Reaktionen sind generell weniger toxisch oder biologisch aktiv, verglichen mit der Ausgangssubstanz. In den meisten Fällen wird durch die Phase II Reaktion die Wasserlöslichkeit eines Substrats weiter erhöht, sogar jenseits von dem durch die Phase I Reaktion erreichten Metaboliten. Das wichtigste Enzym zum Metabolismus von Medikamenten ist das Cytochrom P450 System. Mehr als die Hälfte aller in der Leber metabolisierten Medikamente werden vom Cytochrom P450 System verstoffwechselt. Eine Menge offensichtlich unterschiedlicher Reaktionen werden vom Cytochrom P450 System katalysiert. Grundsätzlich handelt es sich dabei um eine Monooxygenierung des Substrats. Deshalb werden diese Enzyme auch Monooxygenasen oder „mixed-function oxydases“ genannt.

Im Stoffwechsel von Lidocain sind verschiedene Metaboliten bekannt. Je nach Spezies werden die einzelnen Metaboliten unterschiedlich stark erzeugt. Nach Kennaghan et al⁷⁹ erscheint im 24 Stunden Sammel- Urin von Schweinen MEGX zu 14,9% der Ausgangsdosis, im Mensch nur 3,9%. Daten für die Intravenösen Konzentrationen im Schwein sind nicht verfügbar. Da MEGX als intermediärer Metabolit weiterverstoffwechselt wird eignet sich diese Substanz nicht für Bilanzierungen.

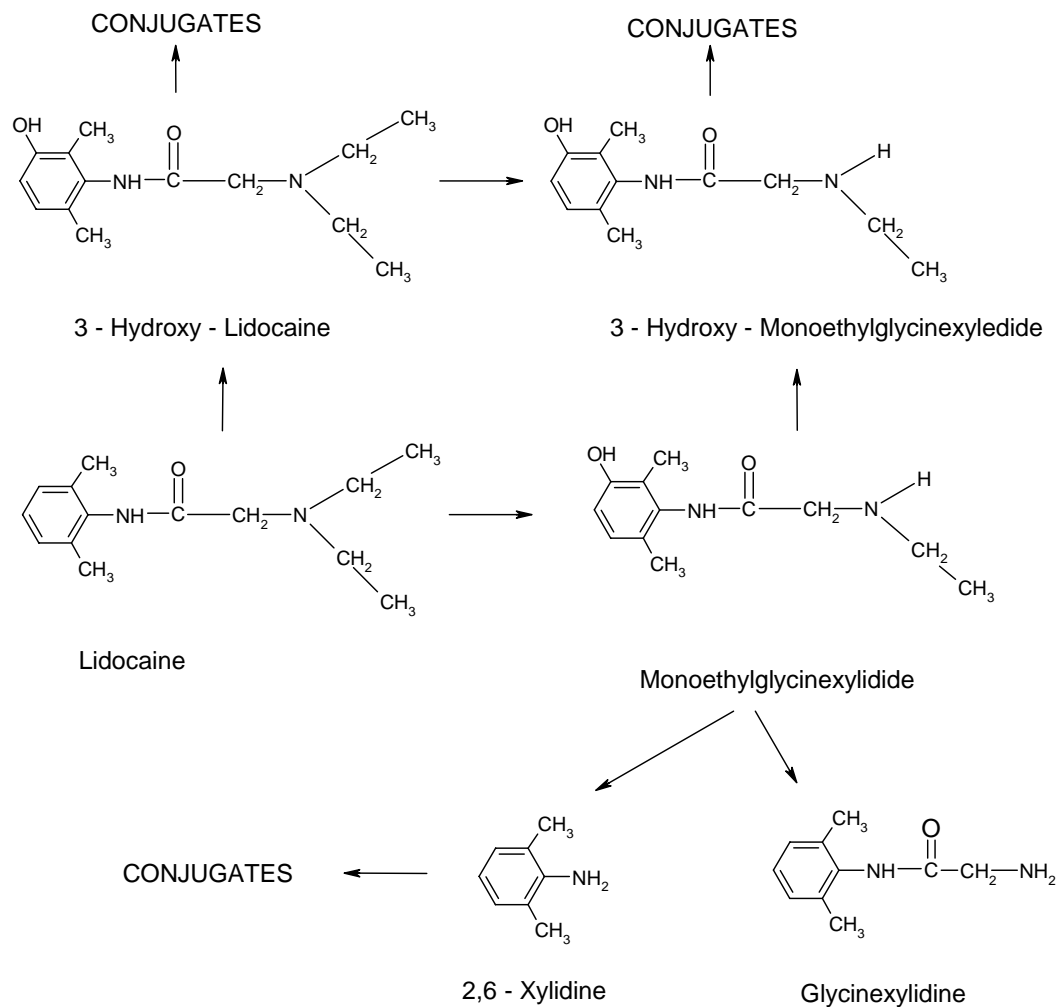


Abbildung 1: Lidocain Stoffwechselwege nach Keenaghan

Der Metabolismus von Lidocain hat sich als guter Marker für die Cytochrom P450 Isoenzym Funktion erwiesen. Im Mensch ist vor allem CYP3A4 das verantwortliche P450 Enzym für die Umwandlung von Lidocain zu Monoethylglycinexylidid (MEGX)⁸⁰, dem wichtigsten Phase I Metaboliten. Die gleiche Studie berichtet auch von beachtlichen interindividuellen Unterschieden.

Die Lidocain Elimination und die Synthese von Megx ist von der Konzentration von Insulin abhängig⁸¹, die in der dynamischen Zellkultur aber konstant ist.

Im porcinen Tiermodell, dem Vergleich von in vivo Leberfunktion mit ex vivo perfundierten Leber ergab sich eine große Ähnlichkeit im Metabolismus, so dass Mets et al die perfundierte Schweineleber als Modell für Metabolische Untersuchungen suggerieren⁸².

1.4.3 Galaktose

Galaktose ist im klinischen Gebrauch eine sichere Substanz, mit physiologischem Vorkommen. Nur bei Menschen die an der seltenen Galaktosämie leiden ist Unverträglichkeit zu erwarten. Beim Säugling und Kleinkind fällt Galaktose in größeren Mengen als Produkt der im Dünndarm stattfindenden Hydrolyse von Lactose an. Beim Erwachsenen muss für die Biosynthese von Glycoproteinen sowie- während der Lactationsphase- von Lactose benötigte Galaktose aus Glucose synthetisiert werden.

In vivo findet der Abbau von Galaktose vor allem in der Leber statt⁸³. Galaktose und ein ATP wird dabei von der Galaktokinase zu Galaktose-1-Phosphat phosphoryliert. Dieses reagiert mit Uridindiphosphatglucose (UDPG) unter Bildung von Uridindiphosphatgalaktose (UDPGal) und Glucose-1-Phosphat. Diese durch das Enzym Galaktose-1-Phosphat-uridyltransferase vermittelte Reaktion besteht also in einem Austausch von Galaktose und Glucose am Uridindiphosphat. Die

Folgereaktion ist eine Epimerisierung der aktivierten Galaktose. Durch die UDP-Galaktose-4-epimerase entsteht UDP-Glucose⁸⁴.

Beim Abbau von Galaktose ist die Galaktokinase das geschwindigkeitsbestimmende Enzym^{85 86}. Die kinetischen Konstanten für diesen Stoffwechselweg im Schwein sind bekannt: $V_{max} = 585 \mu\text{mol/min}$, $K_m = 0,24 \text{ mmol/l}$ (Mittelwerte $n=20$), daraus resultiert der Quotient der Clearance $V_{max}/K_m = 2,44 \text{ l/min}$ ⁸³. Daraus erfolgt eine Einordnung nach Winkler et al in das generelle Clearance Schema⁷⁶. Dieses Schema gilt aber nur für kleine Testdosen ohne Absättigung des Enzymsystems.

Im allgemeinen klinischen Gebrauch wird die Galaktose- Eliminationskapazität(GEK) bestimmt. Die Standard Prozedur für die Bestimmung beginnt mit der intravenösen Injektion von 0,5 g/KG Körpergewicht. Nach der initialen Verteilungsphase von 20 Minuten liegt eine abgesättigte Michaelis-Menten-Kinetik vor, also eine Abbau-Kinetik nullter Ordnung, die durch eine lineare Beziehung zwischen Konzentration und Zeit gekennzeichnet ist. Zwischen der zwanzigsten und der sechzigsten Minute nach der Injektion wird mehrmals die Plasmakonzentration bestimmt. Diese Werte werden extrapoliert und die Eliminationszeit auf der Absissenachse abgelesen. Die GEK wird dann berechnet⁸⁷:

$$GEK = \frac{D - E_r}{t_e + 5} \quad \text{Galaktose Eliminationskapazität (GEK)}$$

D= initiale Dosis i.v., E_r = renale Elimination, t_e = extrapolierte Eliminationszeit, k= Korrekturfaktor für Fehler durch Verteilung (5 min). Die GEK bei Lebergesunden liegt im Bereich von 59 min⁸⁷.

Die Aussage der GEK wird vor allem für die Prognosestellung nach wiederholter intraindividuellem Durchführung geschätzt. In der Akutdiagnostik und der klinischen Entscheidungsfindung ist der Test meist den klinischen Scores unterlegen. Auch korreliert er nicht zwingend mit einem Leberschaden oder mit anderen Parametern wie der Albuminsynthese und der Synthese von Gerinnungsparametern⁸⁸.

Im klinischen Gebrauch gibt es auch die Möglichkeit die Leberfunktion mit Galaktose als Atemtest zu prüfen⁸⁹.

1.4.4 Sorbitol

Sorbit ist ein physiologisch Vorkommender Zucker, der vor allem als Zuckeraustauschstoff Verwendung gefunden hat. Die Insulinunabhängige Verwendung prädestiniert Sorbitol für die diabetisgerechte Ernährung.

Der hauptsächliche biochemische Stoffwechselweg ist die Umwandlung von Sorbitol zu Fructose, die von der Sorbitoldehydrogenase unter Umwandlung von NAD^+ zu NADH und H^+ katalysiert wird. Sorbitol kann durch die Aldosereduktase auch in Glucose umgewandelt werden, dabei wird NADPH und H^+ zu NADP^+ umgewandelt⁸⁴.

Sorbitol ist eine sehr sichere Testsubstanz, nur bei der sehr seltenen angeborenen Fructoseintoleranz kann es zu unerwünschten Wirkungen, vor allem Hypoglykämie, kommen.

Die Elimination von Sorbitol findet in vivo vor allem in der Leber statt, aber ungefähr ein sechstel wird über die Niere ausgeschieden. Die Elimination ist dabei von der Diät und der körperlichen Belastung während des Testvorgangs abhängig⁹⁰. Sorbitol folgt einer Kinetik erster Ordnung über einen weiten Bereich sicherer Dosen⁹¹. Nach Winkler et al erfolgt eine Einordnung in das flusslimitierte Clearance Schema⁷⁶, da die Extraktionsrate bei der Erstpasse durch die Leber bei gesunden Probanden bei 93% liegt⁹⁰.

Die Formel für die Berechnung der Clearance ist deshalb Formel [7] aus Abschnitt 1.4.1:

$$v = F * C_{in} \quad \text{Flussbegrenztes Clearance Schema}$$

Der Test kann im klinischen Gebrauch kann als Bolus- Injektion wie von Molino et al⁹² angewandt oder als Dauerinfusion mit Bestimmung des Fließgleichgewichtes wie von Zeeh et al⁹⁰ durchgeführt werden.

1.4.5 Antipyrin

Antipyrin wurde erstmals Mitte der 70er Jahre als Leberfunktionstest eingesetzt⁹³, es wird heute gelegentlich in der Evaluation der Leberfunktion für Transplantationen verwendet. Durch orale Gabe der Testsubstanz und durch Bestimmung der Konzentration im Speichel, die der Plasmakonzentration gleicht, ist der Test non- invasiv durchführbar. Die Clearance lässt sich einfach errechnen⁹⁴.

Antipyrin wird durch Cytochrom (beteiligt sind folgende Cytochrom P450 Enzyme: CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 und CYP3A4) in den Microsomen in die Hauptmetaboliten 4-Hydroxyantipyrin, 3-Hydroxymethylantipyrin und Norantipyrin verstoffwechselt⁹⁵. Ein Vorteil des Antipyrin Tests ist die Unabhängigkeit der Clearance von der Leberdurchblutung, da diese Substanz keinem nennenswerten First-Pass-Effekt unterliegt.

Ein Nachteil von Antipyrin ist die vergleichsweise Aufwendige Analytik mittels HPLC, die in der täglichen Routine der Qualitätssicherung der Bioreaktoren bei angestrebten Stand- By Betrieb des Leberunterstützungssystems nur schwer zu realisieren sind. In Voruntersuchungen dieser Arbeit zeigte sich Antipyrin auch als schwerfällig in der Handhabung, da es von der Testzeit mit den anderen Substanzen im Cocktail- Bolus- Ansatz im Rezirkulationsmodus des Bioreaktors abweicht.

Im Tiermodell von Gross et al⁹⁶ ergab der Vergleich des Aminopyrin Atemtests mit dem Galaktose Atemtest eine höhere Spezifität des Galaktose Tests. Der Galaktose Test korrelierte auch besser mit dem Umfang der intakten Leberzellmasse. Bei den Atemtest wird Di-¹⁴C-Methylaminoantipyrin bzw. 1-¹⁴C-Galaktose intravenös oder intraperitoneal verabreicht und ¹⁴CO₂ im Atem gemessen.

Das Hauptargument gegen die Verwendung von Antipyrin war die Abdeckung der Cytochrom P450 Enzymfamilie durch das verwendete Lidocain und seinem Metaboliten MEGX. Kompetitive hemmende Effekte sind zu vermeiden.

1.5 Syntheseparameter

1.5.1 Ammoniak und Harnstoffsynthese

Der qualitative Nachweis der Harnstoffsynthese ist in einer Leberzellkultur ein wichtiger Funktionsparameter, der auf die Erhaltung metabolischer Kompetenz hinweist.

Ammoniak entsteht physiologisch vorwiegend durch den Abbau von Aminosäuren im Rahmen des Proteinstoffwechsels. Beim Abbauprozess der Aminosäuren wird der Aminostickstoff als Ammoniak unter Bildung von Ketosäuren abgespalten⁹⁷. Ammoniak hat einen pK'- Wert von 9,1, es liegt bei einem pH Wert von 7,40 zu etwa 99% als Ammoniumion (NH₄⁺) vor. Die Ausscheidung von Ammoniak erfolgt zu ca. 70% als Harnstoff durch die Harnstoffbiosynthese im periportalen Bereich der Leber⁹⁷. Die restlichen 30% werden durch die Glutaminsynthethasereaktion in der perivenösen Leberzellpopulation.

Die Enzyme des Harnstoffzyklus sind auf zwei Kompartimente der Zellen, den Mitochondrien und dem Cytosol verteilt. Der erste Schritt des Harnstoffzyklus findet in den Mitochondrien statt. Dabei reagiert Ammonium mit Hydrogencarbonat und ATP zu Carbamoylphosphat. Das katalysierende Enzym ist die Carbamoylphosphat-Synthetase. Das Carbamoylphosphat reagiert mit Ornithin weiter zu Citrullin mit Hilfe der Ornithintranscarbamoylase. Ornithin ist eine nicht- proteinogene Aminosäure. Citrullin wird nun aus den Mitochondrien in das Cytosol transportiert, wo der Zyklus seinen Fortgang findet. Im Cytosol reagiert Citrullin mit Aspartat zu Argininosuccinat. Katalysiert wird dieser Schritt durch die Argininosuccinat-Synthetase. Aus Argininosuccinat spaltet sich Fumarat ab. Übrig bleibt die Aminosäure Arginin. Das katalysierende Enzym ist die Argininosuccinase. Fumarat wird im Zitronensäurecyclus zu Oxalacetat weiterverarbeitet. Oxalacetat wird durch Transaminierung zu Aspartat umgewandelt und steht wieder für den Harnstoffzyklus zur Verfügung. Im nächsten Schritt hydrolysiert Arginase Arginin zu Harnstoff und Ornithin. Das Ornithin steht für einen neuen Zyklus zur Verfügung, der Harnstoff wird abgegeben ins Blut und über die Nieren und den Harn ausgeschieden.

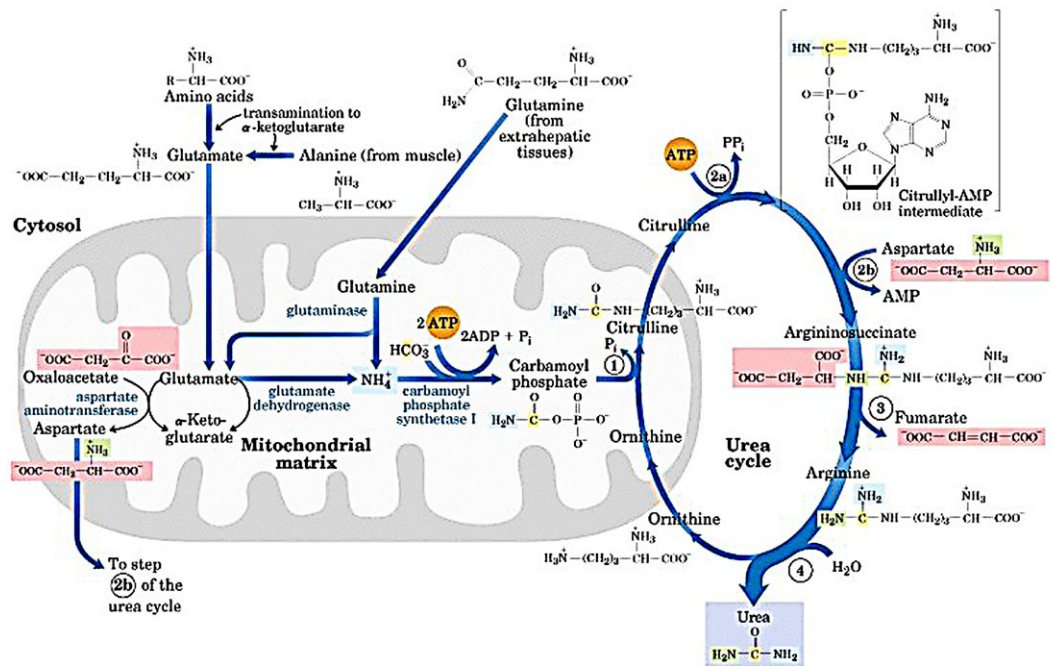


Abbildung 2: Harnstoffzyklus, aus Lehninger: Principles of Biochemistry⁹⁸

Im menschlichen Organismus erfolgt die Regulation und Verstoffwechselung von Ammoniak und Aminosäuren hauptsächlich durch die Leber. Die normale Konzentration von Ammoniak im Blut beträgt 10-50 µmol/l. Die tägliche Bildung von Harnstoff einer 70 kg schweren Normalperson liegt bei etwa 0,5 mol (30 g). Bei Störungen des Ammoniak Stoffwechsels, insbesondere großer Überschuss im extrazellulären Kompartement sind schwere cerebrale Schäden zu befürchten. Bei der hepatischen Enzephalopathie, ein komplexes multifaktorielles Krankheitsbild, spielt Ammoniak eine wichtige Rolle.

In der klinischen Diagnostik wird der Ammoniak Toleranz Test angewendet um den Grad des Portal- Systemischen- Kolateralkreislaufs bei Patienten mit Leberzirrhose abzuschätzen. Dabei wird dem Patienten eine orale Dosis Ammoniumacetat verabreicht und nach 30 und 60 Minuten die Konzentration im peripheren Blutkreislauf gemessen. Der Test korreliert nicht nur mit dem Ausprägungs- Grad des Kolateralkreislaufs, sondern auch mit der portalen Hypertension⁹⁹. Der Ammoniak Toleranz Test ist in modifizierter Variante auch geeignet um die Ursache von Aszitis, zirrhotische versus maligne Genese, zu Differenzieren¹⁰⁰.

Die Abhängigkeit des Harnstoffzyklus von der Aminosäurezufuhr ist zu beachten. Schnellste Umsatzraten werden bei der Zufuhr von Supraphysiologischen AS- Konzentrationen erreicht¹⁰¹. Dies kann man sich für einen Stimulationstest zu Nutze machen.

1.5.2 Aminosäurenstoffwechsel

Der gesamte Aminosäuren- und Ketosäurenstoffwechsel und Proteinbiosynthese ist ein interessanter Ansatz die Funktion von Leberzellen zu Prüfen. Aufgrund der aufwendigen umfassenden Analytik liegen Ergebnisse bis jetzt jedoch nur zu einem Teil vor. Die bisherigen Ergebnisse^{102 103} zeigten, dass die Harnstoffzyklus Aminosäuren Arginin und Ornithin aufgenommen und freigesetzt werden gemäß ihrer normalen Funktion im Zyklus. Putrescin wird synthetisiert und folgt Ornithin im Polyamin- Metabolismus. Die Synthese und Freisetzung von α- Ketosäuren von verzweigtkettigen Aminosäuren reflektiert die Transaminierungs- Kapazität des Kultursystems. Die α-Keto- und Aminosäure Pyruvat und Alanin werden abgegeben als Folge der Degradierung von Zucker zu Pyruvat im Rahmen der Glykolyse.

1.5.3 Albumin

Albumin ist das wichtigste Protein im Blut. Es wird in der Leber synthetisiert und ins Blut

freigesetzt. Die Funktionen von Albumin sind vor allem Erhalt des osmotischen Druckgradienten zwischen intravasalem und extravasalem Kompartiment. Außerdem ist es ein bedeutsames Transportprotein.

Die Albumin- Liberation summiert sich aus der Syntheseleistung gesunder Zellen und Freisetzung durch apoptotische Zellen zusammen.

In statischen Monolayer- Leberzellkulturen ist die Liberation von Albumin im gewechselten Medium alle z.B. 24 Stunden einfach zu bestimmen. Der Verlauf, der unter sophistizierten Kulturbedingungen, d.h. modifiziertes Williams E Medium mit zusätzlichen Aminosäuren und verschiedenen Hormonen, erzielt wird ist ein geringer Wert initial an Tag 0 und ein Anstieg im Verlauf der Kulturdauer über eine Woche². Andere Arbeitsgruppen¹⁰⁴ mit weniger anspruchsvollen Kulturbedingungen berichten von einer „stabilen“ Produktion von Albumin über den Kulturzeitraum. Die Synthese von Albumin ist von Insulin und Glukokortikoiden sowie anderen Hormonen beeinflusst¹⁰⁵.

In der Zellkultur spielt Albumin vor allem eine Rolle als Parameter für die Synthese Leistung der Zellen. Von porcinen Zellen wird Pig- Albumin freigesetzt, das in Leberunterstützungssystemen lediglich zur Charakterisierung der Leistung und zur Qualitätssicherung nützlich ist, aber im therapeutischen Einsatz wegen seiner potentiell antigenen Eigenschaften eher unerwünscht ist.

1.5.4 Lactat

Lactat entsteht im Stoffwechsel der Glucose. Der wichtigste Stoffwechselweg ist der glykolytische Abbau, eine weitere Abbaumöglichkeit für Glucose besteht im Abbau über den Pentosephosphatweg. Die glykolytische Zerlegung von Glucosemolekülen, die auch unter aeroben Stoffwechselbedingungen stattfindet, ist entwicklungsgeschichtlich wahrscheinlich eines der ältesten Stoffwechselwege. Die Reaktionsfolge der Glykolyse ist bei allen eukaryonten Lebewesen identisch, das Prinzip ist die Umwandlung von Glucose in 9 Schritten zu Pyruvat, dabei werden netto zwei Adenosintriphosphat (ATP) gewonnen⁸⁴.

Pyruvat wird dann im Mitochondrium komplett zu CO₂ und H₂O oxydiert oder- unter anabolen Bedingungen durch die Lactatdehydrogenase zu Lactat reduziert und aus der Zelle freigesetzt.

1.5.5 Gluconeogenese

Die Bestimmung der Gluconeogenese in Zellkulturen beruht auf einem einfachen Prinzip: die Zellen werden in glucosereichem Medium kultiviert und die Rate der Gluconeogenese über die gemessene Glucosekonzentration bestimmt. Da eine Ausgewogene Versorgung der Zellkultur als wichtiger angesehen werden muss kommt diese Bestimmung bei einer Zellkultur die auf Funktion optimiert ist nicht zur Anwendung.

1.6 Ziele der eigenen Arbeit

Diese Arbeit wird im Rahmen der Entwicklung eines hybriden Leberunterstützungssystems durchgeführt, dessen Kernstück die Entwicklung eines Bioreaktors ist, der für Leberzellen in klinisch relevanten Mengen ausgelegt ist und für die Leberzellen möglichst nahe an die in vivo Bedingungen herankommen soll. Um das Projekt über tierexperimentelle Erprobung zu klinischen Phase I Studien zu führen ist die Untersuchung der Zelleistung wesentlich.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Funktion des verwendeten dynamischen Zellkulturmodells und die Etablierung von Funktionstests. Dabei sind folgende Fragen zu beantworten:

- 1) Evaluierung und Diskussion von Methoden zur Bewertung der Leberzell- Funktion, welche eine Routine Diagnostik der Funktion der Zellen im verwendeten 3D- Kulturmodell zulassen,
- 2) Empfehlungen für Untersuchungsschemata, welche Veränderungen rechtzeitig aufzeichnen und gleichzeitig aufwendige oder überflüssige Diagnostik vermeiden.
- 3) Nutzbarkeit von Funktionstests hinsichtlich Qualitätssicherung in der Routine Bereitstellung von Leberunterstützungssystemen.

- 4) Beitrag zum Wirksamkeitsnachweis des Bioreaktors, Hypothese: „der Bioreaktor ermöglicht Lebertypische Leistung“ oder zum Zurückweisen der Nullhypothese „der Bioreaktor ermöglicht keine Lebertypische Leistung“.
- 5) Beurteilung einer für den therapeutischen Bereich nutzbaren Kulturdauer des aktuellen Systems.
- 6) Aussagekraft der einzelnen untersuchten Parameter und deren Nutzbarkeit im Hinblick auf eine Standardisierung des Systems für klinische Studien.

2 Material und Methoden

2.1 Das dynamische Kulturmodell

Das Kulturmodell ist als hybrides Leberuntersützungssystem (LSS) entwickelt worden. Es besteht an zentraler Stelle aus einem Bioreaktor, der die Leberzellen beherbergt und Stoffaustausch über synthetische Membranen ermöglicht. Zur mechanischen Unterbringung des Bioreaktors, Steuerung des Stoffwechsels und der Reaktortemperatur wurde ein Bioreaktormonitor entwickelt, der alle zur Versorgung des Bioreaktors benötigten Aggregate in einem mobilen Gehäuse bietet.

2.1.1 Bioreaktor

Der Bioreaktor besteht aus einem Gehäuse aus Polyurethan (PU-R 725 A/B, Rohm & Haas GmbH, Bremen). Das Innere des Bioreaktors besteht aus einem Geflecht von Kapillarrohfaser-membranen, die den Reaktor in intra- und extrakapilläre Kompartimente aufteilen. Die kultivierten Leberzellen sind im extrakapillären Kompartiment angesiedelt und adhären auf der äußeren Oberfläche der Kapillaren. Durch Wahl der Membraneigenschaften und durch jeweils unabhängige externe Ansteuerung eines Kapillarbündels können den Membranen unterschiedliche Funktionen zugewiesen werden. Hydrophile Membranen können über den Anschluss zum Bioreaktorkreislauf für die Zufuhr oder Ausfuhr von Flüssigkeiten genutzt werden. Verwendet wurden Membranen aus Polyethersulfon (Micro PES TF 10® Capillary Membranes, Membrana GmbH, Wuppertal). Hydrophobe, gaspermeable Membranen werden zur Oxygenierung und zur Ver- und Entsorgung von Kohlendioxid verwendet. Eingesetzt wurden Kapillaren aus Doppelschichtmembranen bestehend aus Polypropylen und Polyamid (MHF 200TL Hollow Fiber, Mitsubishi Corporation, Tokyo, Japan). Als weitere Membran zur Oxygenierung wurden alternativ Oxy Plus Membranen (Oxy Plus®, Membrana GmbH, Wuppertal) erprobt. Diese Membranen wurden direkt mit Gas beschickt. Die folgende Tabelle gibt die Eigenschaften der unterschiedlichen Kapillarbündel wieder.

Tabelle 1: Eigenschaften Kapillarbündel

Membran	Verwendung	Cut-off	Kapillarzahl	Austausch- oberfläche
Micro PES TF 10®	Stoffaustausch Zelladhäsion	$200 \cdot 10^3$ MW	6000	1,5 m ²
MHF 200TL Hollow Fiber®	Gasaustausch	impermeabel	640	0,075 m ²
Oxy Plus®	Gasaustausch	impermeabel	600	1,07 m ²

Ein Bioreaktor kann nur einmal benutzt werden.

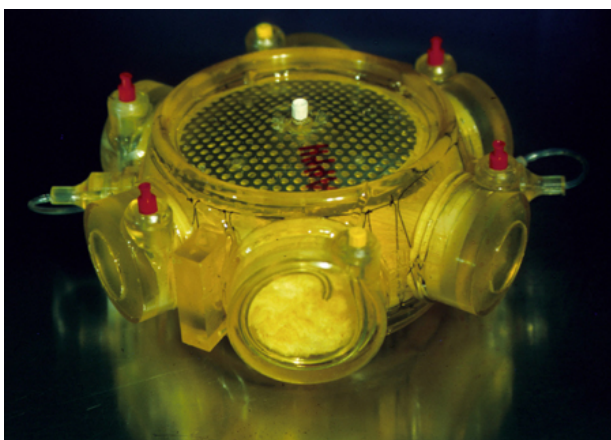
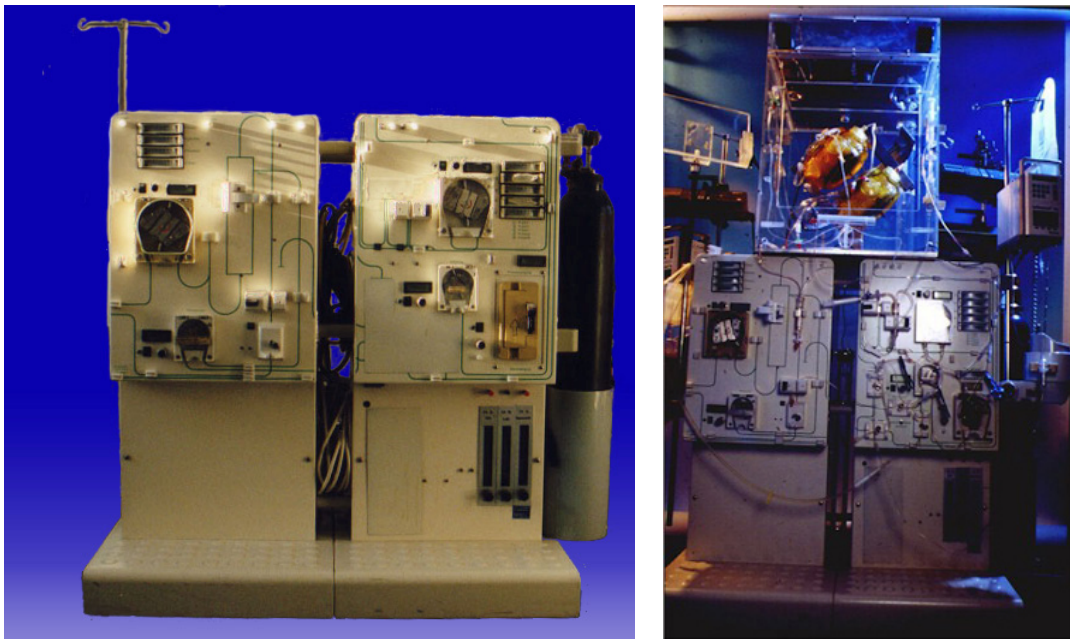


Abbildung 3: Kapillarrohfaserbioreaktor

2.1.2 Bioreaktormonitor

Der Bioreaktor als „Herzstück“ des dynamischen Zellkultursystems wird von in einem beheizten Gehäuse während des Betriebs gehalten. Die Regulation der Mediumzirkulation und der Frischmedium- und Gasversorgung übernimmt das speziell angefertigte Steuergerät, der Bioreaktormonitor.



a)

b)

Abbildung 4: a) Bioreaktormonitor und b) Bioreaktormonitor in Betrieb

Zur Aufrechterhaltung der Zellfunktion und pH- Regulation im Kulturmedium wird das Zellkompartiment im Bioreaktor mit trockenen Gasen (Sauerstoff, Kohlendioxid und Druckluft) begast. Die Entnahme der Gase erfolgt über Hausanschlüsse, wobei in Abhängigkeit zum aktuellen pH-Wert die Gasmischung über geeichte Klein- Durchflussmesser DK 800 R (Krohne Messtechnik, Duisburg) anteilig reguliert wird.

Die Basismischung der Gase beträgt durchschnittlich 95 % Druckluft (Hausanlage) mit 21 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid (AGA 5.0, AGA Gas GmbH Hamburg).

Um der Zellkultur physiologische Temperaturen zu gewährleisten, ist der Bioreaktor von einem Gehäuse aus 8 mm Acrylglas umgeben, das mittels eines Tangentialheizgebläses (230 V / 50 Hz), mit ca. $80 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ Luft nach dem Umwälzprinzip beheizt wird. Die Heizleistung von max. 1000 W ist über ein Leistungsmodul (Kemo, Berlin) regelbar.

Die Messung der Ist-/Soll-Temperatur erfolgt über eine im Gehäuse montierte Messsonde (Typ PT 100, RS Components, Mörfelden-Walldorf), deren Werte über einen im Lüftergehäuse eingebauten, digitalen, selbstoptimierenden Regler (CAL 9900, RS Components, Mörfelden-Walldorf) angezeigt und reguliert werden.

Die Basis der Perfusionseinrichtung bilden zwei miteinander gekoppelte Dialysemonitorrohlinge (HD-Secura, B. Braun Melsungen AG, Melsungen), die aufgabenspezifisch modifiziert sind und als Apparaträger für Pumpen, Klemmventile, Druckanzeigen, Steuerelektronik sowie alle weiteren Systemkomponenten dienen. Die Gesamtapparatur kann auf Rollen bewegt werden und unterteilt sich in einen Patienten- und Bioreaktormonitor (siehe Abbildung).

Um das System stabil und sicher, auch für den klinischen Betrieb zu haben wurden verschiedene Sicherheitsfunktionen in das System integriert. Um physiologisch angepasste Drücke und Volumenströme zu erreichen, finden Schlauchpumpen mit Zahnriemengetriebe (Typ 49 V 437, 348 und 260 B, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) Verwendung. Unter Berücksichtigung der in den einzelnen Zirkulationskreisläufen maximal notwendigen Volumenströme sind für Blutzuführung und Reaktorkreislauf die Pumpen mit einer Förderleistung von maximal 600 ml/min, beziehungsweise

für die Mediumzufuhr bzw. den Mediumablauf, Pumpen mit einer Maximalleistung von jeweils 200 ml/min dimensioniert. Der Förderfluss aller Pumpen ist von Null bis zum jeweiligen Maximalfluss stufenlos manuell regulierbar und über einzelne LCD-Displays ablesbar.

Zur Vermeidung von Druckspitzen und unphysiologischen Strömungsverhältnissen, die unter Umständen zu Schädigung der Zellen und zur Berstung des Bioreaktors und der Perfusionsleitungen führen könnten, sind in den einzelnen Kreisläufen Druckaufnehmer (Typ BV 49 B 90, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) vorhanden. Mit ihnen ist es möglich, durch die Sensoren gemessene Werte die einzelnen Arbeitszustände der Pumpen rück- gekoppelt aufeinander abzustimmen, und bei Überschreitung definierbarer Grenzwerte gegebenenfalls sofort zu stoppen. Ablesung des Ist-Wertes und Einstellung der Schaltgrenzwerte erfolgt über separate Druckanzeiger (Typ 49 V 189, B. Braun Melsungen AG, Melsungen), die in den jeweiligen Monitoren installiert sind. Als druckstabile Leitungen werden Combidynschläuche (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verwendet, die ausgehend von Expansionskammern (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) in den Schlauchleitungssystemen mit den einzelnen Sterilfilter (Minisart, Sartorius AG, Göttingen) geschützten, und in den jeweiligen Monitorplatten montierten Druckaufnehmern verbunden sind.

Um eine Berstung der Leitungssysteme und Bioreaktoren zu vermeiden, ist der Grenzwert für den Prä- Reaktordruck bei 250 mmHg, für den inneren Reaktordruck mit 120 mmHg definiert. Bei Überschreitung dieser Grenzwerte stoppt die Reaktorkreislaufpumpe.

Einem Volumenrückstau und einem retrograden Fluss von Medium entgegenwirkend, findet bei Überschreitung des Post- Reaktordruckes von 15 mmHg eine Aktivierung der Ableitungspumpe statt. In Abhängigkeit zu den Betriebsverläufen können die Grenzwerte für einen optimalen Systemabgleich korrigiert werden.

Der Flüssigkeitstransport am LSS erfolgte durch medical- grade PVC-Leitungen (Sonderanfertigungen von Braun-Carex S.p.A., Mirandola, Italien). Der Leitungsdurchmesser betrug 2,5 mm bis 4,8 mm. Zuzüglich der Expansionskammern und der Einlagen für die Rollerpumpen betrug das Flüssigkeitsvolumen der Leitungen am Bioreaktormonitor 70 ml und am Patientenmonitor 160 ml. Das Gasgemisch für die Gasversorgung wurde durch Perfusor Leitungen aus PVC, (B. Braun Melsungen, Melsungen) geleitet. Ein hydrophober Sterilfilter (B. Braun Melsungen, Melsungen) im Gaskreislauf sorgt für zusätzliche Sicherheit.

2.1.3 Systemaufbau

Die einzelnen Bestandteile des Reaktorkreislaufs (Bioreaktor, Schlauchsysteme, Blasenfallen, Druckmessleitungen, Bakterienfilter, 3-Wege-Hähne, Verbindungen, Adapter) werden als sterilisierte, folienverpackte Einmalartikel geliefert.

Der Zusammenbau erfolgt unter sterilen Arbeitsbedingungen nach Herstellervorschrift in einer Laminar- Air- Flow- Werkbank (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, BRD).

Das geschlossene System wird in den Bioreaktormonitor integriert: der Bioreaktor wird in Halterungen im Plexiglasgehäuse festgeschraubt, der Silastikabschnitt des Kreislaufs in die Rollerpumpe der Kreislaufzirkulation bzw. der des Mediumzulaufs in die Fingerprint- Pumpe der Mediumzufuhr eingelegt, die Gaszuleitung an den Anschluss der Gasmischeinheit und die Druckübertragungsschläuche an die Drucksensoren angeschlossen.

Anschließend wird der Kreislauf mit 0,9% NaCl- Lösung befüllt und entlüftet. Es erfolgt eine Umwälzung des Volumens über die Kreislaufpumpe bis zum Austausch der Kochsalzlösung durch Kulturmedium vor der Zelleinfüllung.

Nach Einstellen des pH-Wertes über die Gasmischung auf pH 7,38 – 7,42 ist der Bioreaktor für das Einbringen der Zellen vorbereitet.

2.1.4 Betriebsmodi des Bioreaktor- Systems

Es sind folgende Betriebsarten vorgesehen: Rezirkulation, Mediumsubstitution, Mediumwechsel sowie für den klinischen Einsatz Therapiebetrieb.

Rezirkulation (Geschlossener Kreislauf):

In der Rezirkulation erfolgt kein Flüssigkeitsaustausch zwischen dem Bioreaktorkreislauf und der Umwelt. In dieser Situation ist sowohl die kontinuierliche Nährstoffeinspeisung, als auch das Auswaschen von Metaboliten und Substraten unterbrochen. Diese für die Zellkultur auf Dauer belastende Betriebsart findet im Rahmen von Metabolismusuntersuchungen und während der Druckmessungen am LSS statt. Die Reaktorpumpe hält die lebensnotwendige Konvektion im Bioreaktor aufrecht. Durch Abklemmen der Mediumeinleitung und Mediumableitung zirkuliert die Flüssigkeit im Reaktorkreislauf in einem geschlossenen System.

Mediumsubstitution (Offener Kreislauf mit langsamer Austauschgeschwindigkeit):

Die Ernährung der Zellen während der Stand- By- Phase und der therapiefreien Intervalle durch Kulturmedium erfolgt in der Betriebsart „Mediumsubstitution“. In den stetigen Bioreaktorkreislauf (Zirkulationsgeschwindigkeit 50-300 mL/min) wird langsam und kontinuierlich durch die Mediumpumpe frisches Medium eingespeist (Geschwindigkeit 50-200 mL/h). Durch die Druckerhöhung im Kreislauf wird gleichzeitig gebrauchtes Medium passiv aus der Zirkulation verdrängt. Über die Position der Druckausgleichskammer im Verhältnis zum Bioreaktor kann das Druckniveau bei dem es zum Ableiten von gebrauchtem Medium kommt beeinflusst werden. Wird die Druckausgleichskammer höher gehängt steigt der Druck im Kreislauf an, wird die Kammer tiefer gehängt kommt es zu einer Erniedrigung des Druckniveaus.

Mediumwechsel (Offenes System mit schnellem Stoffaustausch im „single-pass“ Modus):

Soll ein rascher Austausch der im Reaktorkreislauf zirkulierenden Flüssigkeiten erreicht werden (Entlüften des Bioreaktors, Austausch von Spüllösung gegen Kulturmedium, Vorbereitung des Bioreaktorkreislaufs mit isoonkotischer Lösung vor Therapiestart), kann über den alleinigen Betrieb der Reaktorpumpe und Freigabe des entsprechenden Flüssigkeitsweges ein schneller Wechsel der Flüssigkeit im Bioreaktor und im Reaktorkreislauf durchgeführt werden. Auch im Mediumwechsel-Modus findet eine Durchmischung und Verdünnung statt.

2.1.5 Stand-By Protokoll

Ziele: Gewährleistung der Vitalfunktionen der Zellkultur

- Aufrechterhaltung der Perfusion der Zellkultur.
- Angepasstes Nährstoffangebot und Austausch von Stoffwechselprodukten.
- Aufrechterhaltung einer angemessenen Umgebungstemperatur.
- Bedarfsgerechtes Sauerstoffangebot, Abtransport von Kohlendioxid, Regulation des Säure-Basen-Haushalts.
- Schutz der Zellkultur vor mikrobieller Kontamination.
- Überwachung und Wartung von Teilkomponenten des BELS.
- Funktions- und Qualitätsabschätzung der Zellkultur.
- Protokollierung des BELS-Status und der getroffenen Maßnahmen.

Aufrechterhaltung der Perfusion der Zellkultur:

Die Reaktorpumpe sorgt über die Bewegung der extrazellulären Flüssigkeiten für die Umverteilung von Nährstoffen und Metaboliten im Reaktorkreislauf. Die Art und Weise, in der der erzeugte Flüssigkeitsstrom die Zellkultur umspült, wird durch den Perfusionsmodus bestimmt. Der Konvektionsmodus unter Ausnutzung der beiden unabhängigen Kapillarbündel des Bioreaktors ist als optimaler Perfusionsmodus im Stand-By Betrieb anzusehen. Der Perfusionsmodus und die Geschwindigkeit der Reaktorpumpe legen somit Ausmaß und Geschwindigkeit der Stoffverteilung in der Umgebung der Zellkultur fest. Nur ein kontinuierlicher Betrieb der Reaktorpumpe hält den lebenserhaltenden Kreislauf für die Hepatozytenkultur aufrecht.

Abhängig vom Flüssigkeitsvolumen und dem Gesamtwiderstand des Reaktorkreislaufs beeinflusst die Reaktorpumpe die Druckverhältnisse vor, im und hinter dem Bioreaktor. Für die Sicherheit der Leitungen und des Bioreaktors ist es unerlässlich, folgende Druckwerte beim Betrieb der Pumpe nicht zu überschreiten: Maximalwert „Prä“-Druck: 250 mmHg; Maximalwert „Intra“-Druck: 120 mmHg. Die Druckabschaltung der Reaktorpumpe stellt bei intakter Druckmessung einen Schutz

vor der Drucküberlastung im Reaktorkreislauf dar.

Neben der perfusionstechnischen Sicherheit gilt es im Innern des Bioreaktors physiologische hydrostatische Druckverhältnisse anzustreben: „Intra“-Druck im Bereich von 0 bis + 60 mmHg. Für die Geschwindigkeit der Reaktorpumpe gelten unter Einhaltung der Sicherheitsdruckwerte folgende Richtlinien:

Mindestfluß zur Aufrechterhaltung einer adäquaten Perfusion der Hepatozytenkultur: 50 mL/min
Maximalfluß (unter Einhaltung der Druckgrenzen der Materialsicherheit: „Prä“-Reaktor 250 mmHg, „Intra“-Reaktor 120 mmHg): 300 mL/min

Das Perfusionsverhalten des Bioreaktors ändert sich im zeitlichen Verlauf des BELS-Betriebs. In aller Regel steigen die Druckwerte „Prä“ und „Intra“-Druck. Die Flowrate der Reaktorpumpe muß entsprechend heruntergeregt werden. Ein Unterschreiten der Flußgeschwindigkeit unter 50 mL/min sollte dabei nicht unterschritten werden und hätte die Beendigung des Stand-By dieses Reaktors zur Folge.

Angepasstes Nährstoffangebot und Austausch von Stoffwechselprodukten:

Ab Tag 4 der Zellkultur nach Zelleinfüllung erfolgt eine Mediumsubstitution mit einem Zu- und Abfluß von 50 mL/h frisches Kulturmedium (modifiziertes Williams E Medium). In dieser Einstellung wird gewährleistet, dass frisches Kulturmedium dem Reaktorflow zugeführt wird, das zirkulierende Medium also kontinuierlich angefrischt wird. Am Reaktor ist ein Perfusionsbetrieb einzustellen.

Aufrechterhaltung einer angemessenen Umgebungstemperatur:

1. Die einwandfreie Funktion der Erwärmungsvorrichtungen des BELS ist regelmäßig zu überwachen (Zieltemperatur: 39°C). Steuerung der Zieltemperatur erfolgt über die Solltemperatur der Thermostaten der Erwärmungseinrichtungen.
2. Das Bioreaktorschutzgehäuse muss bis auf Veränderungen des Perfusionsmodus verschlossen bleiben.
3. Die schnelle Einspeisung großer Flüssigkeitsvolumina in den Bioreaktorkreislauf (z. B. Plasma./ Mediaustausch) erfolgt, um ein Auskühlen des Systems zu verhindern, bei Erwärmung der Austauschflüssigkeit

Bedarfsgerechtes Sauerstoffangebot, Abtransport von Kohlendioxid, Regulation des Säure-Basen-Haushalts:

Der Gasaustausch findet an den Oberflächen der Oxygenierungsmembranen im Innern des Bioreaktors statt. Das Sauerstoffangebot lässt sich über die Zusammensetzung und die Durchflusssgeschwindigkeit des Gasgemisches steuern. Die Einstellungen werden an der Gasmischbox des Bioreaktors vorgenommen. Die Flussgeschwindigkeit des Reaktorkreislaufs beeinflusst über die Bewegung der Flüssigkeit zwischen Zelloberflächen und Oberflächen der Oxygenierungsmembranen ebenfalls den Gasaustausch.

Als basale Einstellung der Gasversorgung ist ein Druckluftfluss von 200 mL/min, ein Sauerstofffluss von 20 mL/min und ein Kohlendioxidfluss von 2 mL/min anzusehen. Diese Einstellung erzielt im leeren Reaktor eine physiologische BGA:

pH 7,35-7,45

pCO₂ ≥ 30mmHg und ≤45mmHg

pO₂ ≥200mmHg und ≤260mmHg

Base Excess (ABE) zwischen - 10 bis +2.

Bikarbonat: 15 bis 25 mmol/l.

Kalium: 3,5 bis 4,8 mmol/l

Natrium: 135 bis 145 mmol/l

Calcium: 0,9 bis 1,2 mmol/l.

Interventionen:

Azidose ($\text{pH} < 7,35$):

sorgfältige Analyse der BGA und gezieltes Eingreifen:

1. Reduktion des Kohlendioxidflusses im Gasgemischs bei $\text{pCO}_2 > 45 \text{ mmHg}$.
2. Substitution von Bicarbonat bei $\text{HCO}_3^- < 15 \text{ mmol/l}$.

Die Menge des zu injizierenden Bicarbonats erfolgt in Abstimmung mit dem ABE. Es wird jeweils 1/3 des negativen BE in mL Bicarbonat in einem Bolus gespritzt. Es muss im Verlauf soviel Bicarbonat gespritzt werden, dass der pCO_2 auf den angestrebten Wert geregelt werden kann.

Alkalose ($\text{pH} > 7,45$):

1. Erhöhung des Kohlendioxidflusses im Gasgemischs bei $\text{pCO}_2 < 35 \text{ mmHg}$.
2. Keine zusätzliche Bicarbonatgabe.

Sauerstoffmangel:

1. Erhöhung des Sauerstoffanteils im Gasgemisch bei $\text{pO}_2 < 200 \text{ mmHg}$

Sauerstoffüberfluss:

1. Erniedrigung des Sauerstoffanteils im Gasgemisch bei $\text{pO}_2 > 260 \text{ mmHg}$

In beiden Fällen muss vor allem die korrekte Drucklufteinstellung überprüft und ggf. auf 200 mL/min korrigiert werden. Die Druckluft dient als Trägergas für die anderen Gase. Die Höhe des Druckluftflusses bestimmt die Verweilzeit der anderen Gase im Reaktor.

Jede Veränderung an der Gaseinstellung oder Zuspritzen von Bicarbonat macht regelmäßige BGA Kontrollen notwendig.

2.2 Zellisolierung

Die Gewinnung primärer Schweinehepatozyten für das hybride Leberunterstützungssystem stand am Anfang der Kulturphase. Dabei wurde nach der Hepatektomie eines Schweins die Leber durch Kollagenaseperfusion in zelluläre Bestandteile gebracht, diese wurden gereinigt und in den Bioreaktor eingebracht. Verwendet wurde die von Berry et al¹⁰⁶ entwickelt Methode der high- yield Präparation, die von Gerlach et al^{107 108} für die Bedürfnisse adaptiert und weiterentwickelt wurde.

Die Tierversuche wurden durch die Berliner Senatsverwaltung für Gesundheit genehmigt, Reg.-Nr. O 0057/92.

2.2.1 Tieroperation

Als Spendertiere für die Zellisolierung wurden Hausschweine der deutschen Landrasse beiderlei Geschlechts verwendet. Um eine günstige Bindegewebskonfiguration der Leber vorzufinden wurden Jungtiere mit einem Körpergewicht zwischen 12 und 20 kg verwendet.

Für die Leberzellisolierung werden Schweine von der Firma Schaumann Besitz-Hülensberg GmbH & Co. KG (Schaumann Forschungszentrum Hülensberg Wiesenweg 32, 23812 Wahlstedt) verwendet, die unter pathogenfreien (SPF = specific pathogen free) Bedingungen gefüttert,

gehalten und transportiert werden. Vor der Organentnahme werden die Tiere individuell auf bakterielle und virale Erreger von Zoonosen untersucht (siehe folgende Tabelle).

Tabelle 2: Untersuchungen zum Ausschluss von Zoonosen

Bakteriell	Viral
Leptospira	Influenza A
Brucella	Influenza B
Salmonella paratyphi OH, H, O	Rotavirus
Salmonella typhi H, O	Pseudorabies
Salmonella typhimurium	
Yersinia enterocolitica	
Yersinia pseudotuberculosis	

Das Gewicht der entnommenen Lebern lag zwischen 300 und 680g, was einer Ausbeute von 2,2 bis 4,0 x 10⁹ Zellen entspricht.

Eine PERV Analytik wurde in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut in Berlin seit 1997 durchgeführt.

Der Operationsablauf erfolgte nach einem festen Procedere, basierend auf einer Hepatektomie OP. Nach 6-stündiger Nahrungskarenz wurden die Tiere mit Azaperon (Stresnil-Janssen®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) 3-4 mg/kg KG und 0,05 mg/kg KG Atropin (Atropinsulfat Braun®, Braun Melsungen, Melsungen) prämediziert. Anschließend erfolgte die Intubation, kontrollierte Beatmung und eine TIVA, die aus der Kombination von Etomidat (Metomidate-Jansen®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) 0,2-0,25 mg/kg KG /h und Fentanyl (Fentanyl-Janssen®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) 1-2 ml/h bestand.

Die Tiere wurden nach klinischen Standards für die OP vorbereitet und in einen OP-Saal der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum eingeschleust.

Die Tiere wurden Laparotomiert und der Leberhilus freipräpariert. Danach folgte die Kanülierung der zuleitenden Gefäße, zuerst der A. Hepatica mit einer der Gefäßwandstärke angepassten Knopfkanüle, und dann der V. Portae mit einer Kanüle aus Silastik. Nach der Kanülierung wurde die Kanüle der V. Portae mit der Zuleitung von Isolierungslösung A verbunden, dann die V. Hepatica durchtrennt. Noch in situ wurde mit der Perfusion der Leber begonnen. Die Tiere wurden nach erfolgter Organentnahme durch Blutentzug getötet.

2.2.2 Zellisolierungs- Prozess

Die Organperfusion und Präparation der Zellsuspension erfolgte dann in einer speziellen laboreigenen Perfusionsapparatur. Für diese Apparatur wurde ein Dialysemonitorrohling der Braun Melsungen, Melsungen) modifiziert. In dem Gehäuse wurde eine Arbeitsfläche geschaffen, auf der sich durch sterile OP Tücher geschützt ein auf 40°C elektrisch beheizbares Stahlrundgefäß befand, in dem die Leber schwimmend gelagert wurde.

In der Perfusionsapparatur waren auch drei stufenlos regulierbare Rollerpumpen für die Zirkulation (Pumpe 1 für die A. Hepatica, Pumpe 2 für die V. Portae) und den Ablauf (Pumpe 3) der Isolierungslösungen integriert. Eine ebenfalls integrierte Druckmessung diente der Feed- Back- Regulation der Pumpe für die A. Hepatica.

Zur Zellgewinnung wurde die entnommene Leber durch Perfusion mit Kollagenase in zelluläre Bestandteile gebracht. Mit fünf Arbeitsschritten löst man den Zellverband Stufenweise auf. Während Lösung A noch in situ nur durch Schwerkraft perfundiert wird, werden die anderen Lösungen in der Perfusionsapparatur fluss- bzw. druckgesteuert perfundiert. Über die V. Portae wird mit einem Fluss von 2 ml * (min * g Lebergewebe)⁻¹, also einem Gesamtfluss von 500 bis 800

ml/min perfundiert. Die A. Hepatica wird druckgesteuert mit im Durchschnitt 80 mmHg perfundiert. In Abhängigkeit des Lebergewichtes wird die Leber insgesamt mit bis zu 1000 ml/min Isolierungslösung durchströmt. Während der gesamten Zeit ist auf die Vermeidung von Druckstellen zu achten.

Lösung A dient zum Freispülen von Blut, zum entfernen von Calcium und zum Herabsetzen der Lebertemperatur auf Raumtemperatur zur Vermeidung eines warmen hypoxischen Schadens. Lösung B dient der Calciumfreien Perfusion zur Auflockerung der desmosomalen Verbindung unterhalb der Hepatozyten. Lösung C ergänzt Calcium wieder, da die Kollagenase von Ca^{++} Ionen Abhängig ist. Außerdem erwärmt Lösung C die Leber wieder auf 37°C , das Reaktionsmaximum der Kollagenase. Lösung D ist der wichtigste Schritt, da diese Lösung die Kollagenase enthält, die zur Auflösung des Bindegewebes der Leber erforderlich ist. Wenn die Leber ausreichend aufgelöst ist, spätestens nach 15 min wird Lösung D abgepumpt und mit Lösung E die Wirkung der Kollagenase beendet. Nach initialen Freispülen mit Lösung E wird in diesem Schritt wird die Leberkapsel perforiert, die Leberzellen werden in Lösung gebracht und gleichzeitig gekühlt. Die Zellsuspension wird in einen sterilen Zellwaschbeutel verbracht und zur weiteren Zellreinigung in den Kühlraum gebracht.

Tabelle 3: Zellisolierungslösungen

Alle Lösungen wurden von der Firma Biochrom, Berlin bezogen.

Lösung	Menge	T	Durchführung	Zusammensetzung
A	2 l	$20^{\circ}\text{C} \pm 2$	Single Pass	2000 mL PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 1% Penicillin/Streptomycin (5 mL/500 mL) + 1% Amphotericin B (5 mL/500 mL) + 0,2% EDTA-Lösung (1 mL/500 mL)
B	2 l	$20^{\circ}\text{C} \pm 2$	Rezirkulation 20 min	2000 mL PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 1% Penicillin/Streptomycin (5 mL/500 mL) + 1% Amphotericin B (5 mL/500 mL) + 1% NaHCO_3 -Lösung (5 mL/500 mL) + 1% Glucose 10% (5 mL/500 mL)
C	1 l	37°C	Single Pass	500 mL Medium 199 mit HEPES + 1% Penicillin/Streptomycin (5 mL/500 mL) + 1% Amphotericin B (5 mL/500 mL)
D	1 l	37°C	Rezirkulation bis zu 15 min	1000 mL Medium 199 mit NaHCO_3 oder Williams Medium E mit NaHCO_3 + 1% Penicillin/Streptomycin (5 mL/500 mL) + 1% Amphotericin B (5 mL/500 mL) + 0,04% Kollagenase (0,4 g /1000 mL) unmittelbar vor Gebrauch sterilfiltriert der Lösung zusetzen!!!
E	1 l	4°C	Single Pass	2000 mL Medium 199 mit HEPES + 1% Penicillin/Streptomycin (5 mL/500 mL) + 1% Amphotericin B (5 mL/500 mL)

2.2.3 Zellaufbereitung und -einfüllung

Die Zellen sedimentierten im Kühlraum bei 5°C zehn Minuten im Zellisolierungsbeutel. Dann wurde der Überstand der Isolierungslösung in den über ein Ventil verbundenen Ablaufbeutel abgeleitet und frisches Medium wurde aus dem ebenfalls mit einer Schlauchklemme verbundenen Reservoir der Lösung E wieder zugeleitet, der Zellkulturbeutel wurde geschüttelt und wieder zum Sedimentieren aufgehängt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Methode der Zellwäsche in einem in sich geschlossenen System hat gegenüber der herkömmlichen Zellreinigung in Zentrifugen ein geringeres Verkeimungsrisiko.

Vor der Besiedlung des Bioreaktors mit Hepatozyten wird das Gesamtvolumen der Zellsuspension und die initiale Viabilität bestimmt. Durch einbringen einer Probe der Suspension in einer Neubauer Zählkammer ermittelt man lichtmikroskopisch die Zellzahl pro Mikroliter.

Der Zellisolierungsbeutel mit den gereinigten Zellen wurde über einen Dreiwegehahn mit großem Lumen (B. Braun Melsungen, Melsungen) an die Zelleinfüllung des Bioreaktors angeschlossen. Am dritten Ende des Dreiwegehahns war eine Perfusorspritze (B. Braun Melsungen, Melsungen) angeschlossen, mit der die Zellen langsam aus dem Beutel und in den Bioreaktor gepumpt wurden. Um die Zellen möglichst gleichmäßig zu Verteilen wurde am Bioreaktor jeden Spritzenhub die Zelleinfüllkappe mittels Dreiwegehahn umgeschaltet.

2.2.4 Adhäsionsphase

Als Zelladhäsionsphase werden die ersten 24 h der Hepatozytenkultur nach der Zellefüllung in den Bioreaktor bezeichnet. In dieser Zeit erfolgen die Adhäsion, das Auswachsen aus den Aggregaten und die Wiederherstellung der Stoffwechselhomöostase der Hepatozyten. Das Herauslösen der Hepatozyten aus dem Leberzellverbund und die Aufhebung der Interaktion mit den anderen Organen des lebenden Organismus stellen bedeutende Veränderungen der Lebensbedingungen der Zellen dar. Durch eine Reihe von Komponenten wie der Verlust der Zellausrichtung und Zellkontaktes und der Aussetzung an der hypothermen Hypoxie und der Enzymwirkung der membranschädigenden Kollagenase stellt der Vorgang der Zellisolierung und der Aufbereitung bis zur Zelleinfüllung eine bedeutende Belastung für die Integrität der einzelnen Zellen dar.

Dementsprechend sind die Wiedererwärmung, die Reoxygenierung, die Nährstoffversorgung, die Wachstumsfaktorenwirkung durch Tierplasmasubstitution und die Rotation des Bioreaktors zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen im Zellkompartiment entscheidend für einen erfolgreichen Adhäsionsprozess. Ziel des letzten ist die Zellhaftung und –ausbreitung auf den Kapillaren und die Wiederherstellung der Homöostase durch Ausgleich der Nährstoff- und Sauerstoffschuld und durch Rekonstruktion des Zytoskeletts und der Zellpolarität.

2.3 Viabilitätsuntersuchungen und Analytik

2.3.1 Bolus Leberfunktionstests

Bei den Bolus Leberfunktionstests wird der zeitabhängige Umsatz von Substraten im geschlossenen Reaktorkreislauf beurteilt. Folgende Substanzen werden in der angegebenen Dosis in den Bioreaktorkreislauf eingebracht:

Tabelle 4: LFT Substanzen für Bolustests

Substanz	Dosis
Lidocain/MEGX (Lidocain 1%, Apotheke des Virchow-Klinikums, Humboldt-Universität, Berlin)	3mg
Sorbitol (Sorbitol 40%, SerumWerk Bernburg AG, Bernburg)	1,8g
Galactose (Galaktose 25%, Apotheke des Virchow-Klinikums, Humboldt-Universität, Berlin)	1,5g
Ammoniak (0,05 molar NH ₄ Cl, Apotheke des Virchow- Klinikums, Humboldt-Universität, Berlin)	750 µmol

Die Durchführung des Leberfunktionstests umfasst folgende Schritte:

1. Betriebsart Rezirkulation wählen
2. Leerwerte für alle Parameter gewinnen (Zeitpunkt 0)
3. Unmittelbar im Anschluss alle Testsubstanzen injizieren
4. Nach 90 Minuten Verlaufswerte erheben (Zeitpunkt 90)
5. Betriebsart Mediumsubstitution wählen

Auf die exakte Dosierung und Handhabung ist zu achten um Fehler gering zu halten.

Die Leerversuche, mit Bioreaktoren ohne Zellen, erfolgen mit dem gleichen Procedere.

Die metabolischen Leberfunktionstests wurden am Tag 0 im zellfreien Bioreaktor durchgeführt. Dann als Standard mit Zellen am Kulturtag 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 und alle folgenden 3 Tage. Aus verschiedenen Gründen wurden manchmal die Tests auch an anderen Tagen durchgeführt, so dass für die Auswertung Kategorien der Kulturtage geschaffen wurden.

Für die Auswertung wurde die Differenz der gemessenen Konzentration der jeweiligen Substanz zum Zeitpunkt 90 min ($C_{90\text{min}}$) minus der Ausgangskonzentration zum Zeitpunkt 0 min ($C_{0\text{min}}$) als delta- Wert (Δ -Substrat) berechnet. Der delta- Wert gleicht die ungleichen Zeitintervalle zwischen aufeinander folgenden metabolischen Bolustests aus.

$$\Delta\text{Substrat} = C_{90\text{min}} - C_{0\text{min}}$$

Abbildung 5: Berechnung zur Normalisierung der Bolus LFT Werte

2.3.2 Kontinuierliche Leberfunktionstests

Mit Hilfe von Leberfunktionstests (LFT's) erfolgte die Beurteilung der Stoffwechselleistungen der Hepatozyten. Dazu wurden unterschiedliche Testsubstanzen kontinuierlich zusammen mit dem Nährmedium in den Reaktorkreislauf eingebracht. Kontrolliert wurde die gleichmäßige Zugabe von den LFT-Testsubstanzen durch Abnahme von Mediumleerwerten aus den Mediumbeuteln.

Der Bioreaktor wurde entsprechend dem Protokoll für die Stand-By Kulturphase betreut. Die Entnahme der Proben für die Analytik erfolgte einmal täglich zur gleichen Uhrzeit. Am Tag 0, dem tag der Zelleinfüllung wurde nach 1 und 6 Stunden eine Probe entnommen. In den folgenden 3 Tagen dann jeweils einmalig, danach im 3 Tages Rhythmus.

Die Testsubstanzen wurden vor dem Anschluss eines neuen Mediumbeutels unter sterilen Bedingungen mit folgenden Zielkonzentrationen in diesen eingespritzt:

Tabelle 5: LFT Substanzen für kontinuierliche Tests

Substanz	Konzentration
Lidocain (Lidocain 1%, Apotheke des Virchow-Klinikums, Humboldt-Universität, Berlin)	6 mg/l
Sorbitol (Sorbitol 40%, SerumWerk Bernburg AG, Bernburg)	1 g/l
Galaktose (Galaktose 25%, Apotheke des Virchow-Klinikums, Humboldt-Universität, Berlin)	1 g/l

Die Testmethode basiert auf der Messung des Fliesgleichgewichts der Elimination der entsprechenden Testsubstanz.

Um den systematischen Fehler durch die manuelle Zugabe der Testsubstanzen in die Medienbeutel zu minimieren wurde die Konzentration der Testsubstanzen im Mediumreservoir (C_{Medium}) bestimmt und die gemessene Konzentration der Substanzen im Bioreaktorkreislauf (C_{Probe}) davon subtrahiert. Der daraus resultierende Wert wurde nach dem Substrat bezeichnet.

$$\text{Substrat} = C_{\text{Medium}} - C_{\text{Probe}}$$

Abbildung 6: Berechnung zur Elimination systemischer Fehler Ausgangskonzentration Substrat im Medium

2.3.3 Lidocain

Lidocain wurde mit dem TDx/TDxFLx Lidocain Assay Testkit in einem TDx System (beides Abbott Laboratories, IL, USA) analysiert. Der Lidocain Assay beruht auf dem Prinzip des Fluoreszenzpolarisations- Immunoassays (FPIA).

Am Anfang jeder Messungen erfolgte die Überprüfung der Kalibrierung des TDx System, weiter Qualitätssicherung erfolgte durch die Messung einer Lidocain Kontrollkonzentration während jedem Durchlauf des Probenkarussells.

Das Testkit wurde gemäß Bedienungsanleitung verwendet.

2.3.4 MEGX

Monoethylglycinexylidide wurde mit dem TDx/TDxFLx MEGX Assay Testkit in einem TDx System (beides Abbott Laboratories, IL, USA) analysiert. Der MEGX Assay beruht wie der Lidocain Testkit auf dem Prinzip des Fluoreszenzpolarisations- Immunoassys (FPIA).

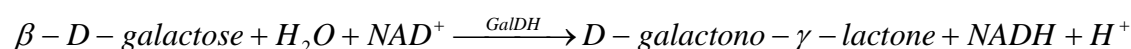
Am Anfang jeder Messungen erfolgte die Überprüfung der Kalibrierung des TDx System, weiter Qualitätssicherung erfolgte durch die Messung einer MEGX Kontrollkonzentration während jedem Durchlauf des Probenkarussells.

Das Testkit wurde gemäß Bedienungsanleitung verwendet.

2.3.5 Galaktose

Die Bestimmung von Galaktose erfolgt indirekt photometrisch durch Messung von NADH bei 365 nm mit einem Corbas Fara II Analyzer, Hoffman La Roche, Grenzach. Als Enzym wurde β -Galactose Dehydrogenase (GalDH) aus *Pseudomonas Fluorescens* von Boehringer Mannheim Laboratories, Mannheim verwendet¹⁰⁹.

Reaktions- Gleichung:

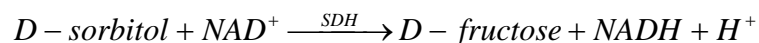


Das Prinzip der Testreaktion ist die Oxydation von Galaktose zu Galaktonolacton verbunden mit der Umwandlung von NAD⁺ zu NADH. Als Umgebungsbedingungen der Reaktion wurde 25°C, pH 9 und Tris-HCL Puffer gewählt.

2.3.6 Sorbitol

Die Bestimmung von Sorbitol erfolgt indirekt photometrisch durch Messung von NADH bei 365 nm mit einem Corbas Fara II Analyzer, Hoffman La Roche, Grenzach. Als Enzym wurde Sorbitol Dehydrogenase (SDH) aus der Schafs Leber von Boehringer Mannheim Laboratories, Mannheim verwendet¹¹⁰.

Reaktions- Gleichung:



Das Prinzip der Testreaktion ist die Oxydation von Galaktose zu Galaktonolacton verbunden mit der Umwandlung von NAD⁺ zu NADH. Als Umgebungsbedingungen der Reaktion wurde 25°C, pH 9 und Tris-HCL Puffer gewählt.

2.3.7 Albumin

Pig-Albumin wurde immunoturbidimetrisch bestimmt. Das Prinzip dieser Methode ist die Messung der Adsorption der Trübung einer Suspension mit Immunkomplexen, bestehend aus dem zu bestimmenden Protein und dagegen gerichtete Antikörper. Dabei wurde ein Zentrifugal-Analysegerät (Cobas Fara II Analyzer, Hoffmann La Roche, Grenzach) eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit gegen Pig-Albumin gerichtetem Kaninchen-Antiserum (Nordic, Biogenzia, Bochum). Gereinigtes Pig-Albumin wurde als Standard verwendet (Nachweisgrenze: 2 µg/ml).

2.4 Statistik

Das Codebook, die Zusammenstellung aller Variablen mit Typ und Art der Erfassung, für die Daten wurde im Rahmen der Entwicklung einer Access Datenbank (Version 7, Microsoft Corporation, Redmond, USA) erstellt. Die Datenauswertung erfolgte mittels dem SPSS 11.5 Software Packet von SPSS Inc., Chicago, USA. Die ausgewählte Statistik basiert auf den Methoden, die in den Büchern von Felix Brosius¹¹¹, Julie Pallant¹¹² und Hans-Ullrich Harten et al¹¹³ und der Wolfram Research Webseite von Eric Weisstein¹¹⁴ beschrieben sind. Die Auswahl der verwendeten statistischen Methoden, die einfaktorielle ANOVA und der T-Test für unabhängige Stichproben, beruhen auf der Art der jeweils zugrunde liegenden Daten und wird jeweils bei der Exploration der Daten im Ergebnisstil begründet. Es wurden die gängigen Standardverfahren für die vorliegenden

Daten benutzt.

2.4.1 Statistische Prüfung von Unterschieden zwischen Mittelwerten

Ein statistischer Test ist ein statistisches Prüfverfahren, mit dessen Hilfe beurteilt werden kann, ob man aufgrund vorliegender Messwerte die so genannte Nullhypothese annehmen oder verwerfen kann. Mit einer Nullhypothese wird behauptet, dass sich beispielsweise zwei Mittelwerte nicht signifikant voneinander unterscheiden, da deren Unterschiede nur auf zufällige Verzerrungen zurückzuführen sind. Über die Annahme oder Ablehnung einer Nullhypothese wird aufgrund eines statistischen Tests, eines so genannten Signifikanztests, entschieden. Wird die Nullhypothese abgelehnt, dann wird eine Alternativhypothese formuliert, die davon ausgeht, dass der Unterschied zwischen den Mittelwerten nicht zufällig entstanden sondern statistisch bedeutsam, also signifikant ist.

Bei der Prüfung statistischer Hypothesen können prinzipiell zwei Arten von Fehlern gemacht werden: Fehler 1. Art (Alpha-Fehler) und Fehler 2. Art (Beta-Fehler). Ein Fehler 1. Art liegt vor, wenn die Nullhypothese abgelehnt wird, obwohl sie richtig ist. Von einem Fehler 2. Art spricht man, wenn die Alternativhypothese abgelehnt wird, obwohl sie richtig ist.

Die Signifikanztests enthalten nun Berechnungsverfahren, um aus den gegebenen Stichprobenwerten Prüfgrößen zu bestimmen. Diese Prüfgrößen folgen wiederum bestimmten theoretischen Verteilungen aus denen man die so genannte Irrtumswahrscheinlichkeit p berechnen kann. Diese Irrtumswahrscheinlichkeit p ist die Wahrscheinlichkeit, einen Fehler 1. Art zu begehen, d.h. die Nullhypothese zu verwerfen, obwohl sie richtig ist und stattdessen die Alternativhypothese anzunehmen.

Die so bestimmte Irrtumswahrscheinlichkeit p wird als Wert zwischen 0 und 1 oder zwischen 0 und 100% angegeben. Der Wert, das so genannte Signifikanzniveau, bei dem man sich entschließt, die Nullhypothese zu verwerfen, ist prinzipiell frei wählbar.

Für die Prüfung der Unterschiede zwischen Mittelwerten wurden der T-Test und die ANOVA angewendet. Bei beiden ist der sprachliche Gebrauch für das Signifikanzniveau und übliche Grenzwerte, repräsentiert durch die Irrtumswahrscheinlichkeit p gleich:

Tabelle 6: sprachliche Interpretation des Signifikanzniveaus

Irrtumswahrscheinlichkeit p (bzw. alpha)	Sprachgebrauch
$p \leq 0,01$	Hochsignifikant
$p \leq 0,05$	Signifikant
$p > 0,05$	Nicht signifikant

2.4.1.1 ANOVA

Mit einer einfaktoriellen ANOVA (ANalysis Of VAriance) lässt sich, ähnlich dem T-Test für unabhängige Stichproben, eine Hypothese überprüfen, der zufolge eine Variable in unterschiedlichen Teilgruppen der Grundgesamtheit einen gleich hohen Mittelwert aufweist. Mit der ANOVA lassen sich mehrere Mittelwerte von mehreren Teilgruppen der Grundgesamtheit vergleichen. Die einfaktorielle (one-way) ANOVA lässt eine Gruppierungsvariable zu.

2.4.1.2 T-Test

Der T-Test bei unabhängigen Stichproben überprüft wie die ANOVA Unterschiede zwischen den Mittelwerten. Im Gegensatz zur ANOVA ist der T-Test dabei auf zwei Teilgruppen beschränkt.

2.4.2 Graphen

2.4.2.1 Fehlerbalken- Diagramm

Mit einem Fehlerbalken- Diagramm kann man den Mittelwert und die Streuung, im Falle dieser Arbeit repräsentiert durch die 2- fache Standardabweichung, darstellen. Die Streuung liefert Informationen über den wahrscheinlichen Mittelwert in der Grundgesamtheit.

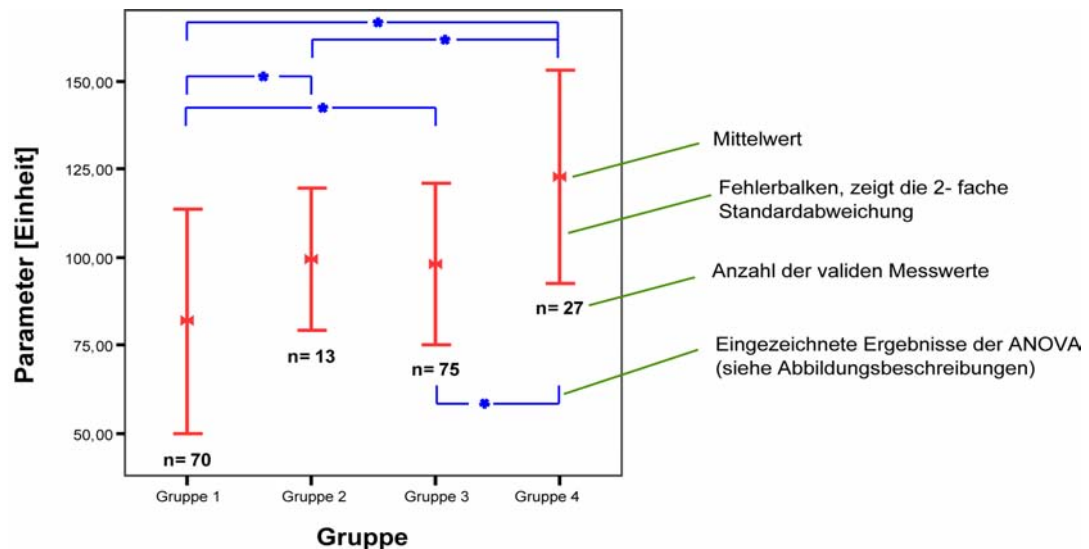


Abbildung 7: Fehlerbalkendiagramm mit erklärender Darstellung

2.4.2.2 Boxplot

Der Boxplot stellt an der Abszisse die Gruppen dar. Die Quartilen sind die obere und untere Begrenzung der Box, der Median ist der Balken in der Mitte. Die T-förmigen Ausläufer der Boxen sind die größten und kleinsten Werte, das Maximum und Minimum. Kreise sind Ausreißer, im Bereich von mehr als das 1,5 fache der Boxlänge, gerechnet ab der äußeren Kante der Box. Extremwerte, mit über der 3 fachen Entfernung der Boxlänge, sind –so weit dargestellt– Sternförmig.

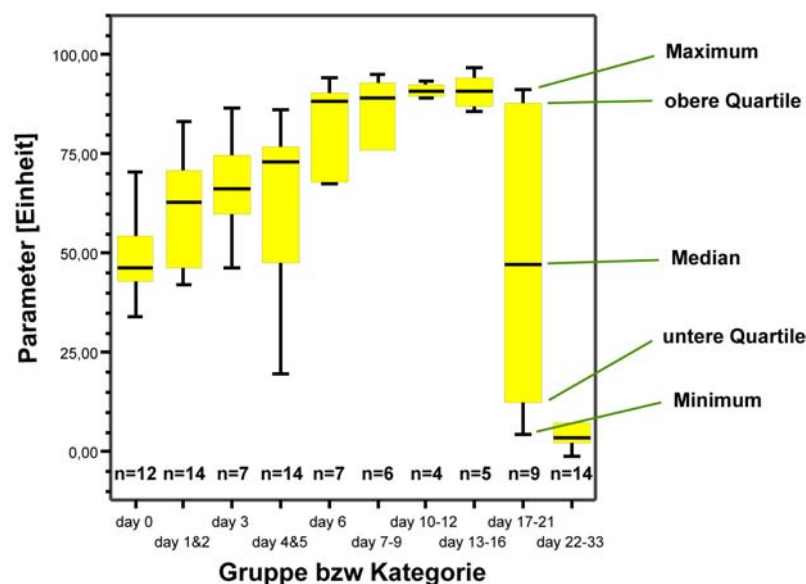


Abbildung 8: Boxplot mit erklärender Darstellung

3 Ergebnisse

3.1 Metabolische Untersuchungen – Bolus LFTs

Bei allen Testsubstanzen sind beachtliche interindividuelle Unterschiede zwischen den aus verschiedenen Organen isolierten Zellkulturen in den Bioreaktoren zu beobachten. Die Verläufe über die Kulturtage haben generell eine sichtbare Tendenz. In den ersten drei Tagen ist bei allen Substanzen ein Anstieg in der Clearance und größere Schwankungen zu sehen.

Um auf die Fragestellung der Nutzbarkeit der Bolus LFT zur Qualitätssicherung einzugehen wurden die Bioreaktoren nach funktionellen Kriterien in 4 Gruppen aufgeteilt, je nach Verlauf der Bioreaktoren.

Tabelle 7: Bioreaktor-Gruppen – Quality Assessment mit Bolus Test

QA Gruppe (englische Bezeichnung)	Beschreibung
Standard (Standard)	Alle Bioreaktoren, mit primären porcinen Leberzellen, welche nicht in eine der anderen Gruppen fallen.
Therapie (Therapy)	Alle Bioreaktoren, mit primären porcinen Leberzellen, welche zur Therapie an einem Patienten eingesetzt wurden.
Infiziert (Infected)	Alle Bioreaktoren, mit primären porcinen Leberzellen, welche zumindest hochwahrscheinlich infiziert waren.
Zellfreier Bioreaktor (Blind-Device)	Bioreaktoren ohne Leberzellen als Kontrolle.

3.1.1 Lidocain

Die Werte sind hinreichend normalverteilt und auf Intervallskalenniveau. Insgesamt liegen für delta-Lidocain (Δ -Lidocaine) 179 Messwerte vor. Das Minimum liegt bei 0,02 ng/ml, das Maximum erzielte ein infizierter Bioreaktor mit 6,67 ng/ml. Es handelt sich mit größter Wahrscheinlichkeit um einen Summationseffekt durch die Stoffwechselleistung der Bakterien. Ein Bioreaktor, der nicht in die Statistik einging, erreichte 10-fach höhere Werte bei der Lidocain Elimination sowie der MEGX Synthese. Die wahrscheinlichste Erklärung retrospektiv dafür ist ein Verdünnungsfehler um eine Zehnerpotenz bei der Herstellung der Injektionslösung. Die maximale Clearance dieses Bioreaktors beträgt 3,65 ng/ml am 6. Tag.

Eine einfaktorielle ANOVA zwischen den Bioreaktor-Gruppen wurde zur Erkundung der Unterschiede durchgeführt. Die Homogenität der Varianz ist knapp signifikant im Levene Test, Levene- Wert 2,462; Signifikanz 0,06. Zwischen den 4 Gruppen ergab sich ein statistisch hochsignifikanter Unterschied, $F(3, 175)=36,66$; $p=0,000$. Zu Bewertung der Validität des Effekts wurde Eta-Quadrat berechnet mit 0,38, dies ist nach Cohen ein großer Effekt. Der Post-Hoc Vergleich mit dem Turkey HSD Test zeigt, dass der Mittelwert der Standard Gruppe ($M=0,44$; $SD=0,26$) sich signifikant ($\alpha=0,05$) von dem Mittelwert der Gruppe „Zellfreier Bioreaktor“ ($M=1,79$; $SD=0,56$) unterscheidet, aber nicht zu den Mittelwerten der Gruppen „Infiziert“ ($M=0,64$; $SD=0,78$) und „Therapie“ ($M=0,45$; $SD=0,21$).

Um besser auf die Fragestellung der Hypothese: „der Bioreaktor ermöglicht Lebertypische Leistung“ bzw. auf das Zurückweisen der Nullhypothese einzugehen wurde ein T-Test bei unabhängigen Stichproben durchgeführt, zwischen den Gruppen „Standard“ ($M=0,44$; $SD=0,26$) und „Zellfreier Bioreaktor“ ($M=1,79$; $SD=0,56$). Da bei den beiden Gruppen der Levene Test die Homogenität der Varianz nicht nachgewiesen hat wurden die T-Test Werte für diese Ausgangssituation berechnet. Der T-Test ergab folgende Werte: $t(29,58) = -11,85$; $p=0,000$, das bedeutet ein Zurückweisen der Nullhypothese ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0% behaftet. Eta Squared ist 0,61; d.h. mit 61% Chance treffen diese Werte auf die Grundgesamtheit zu. Das Eta Quadrat fällt vor allem wegen den wenigen Messwerten der Gruppe „Zellfreier Bioreaktor“ ($N=26$) relativ gering aus. Die wenigen Werte sind durch die geringe Anzahl von Bioreaktoren bzw. Tagen in dieser Gruppe bedingt.

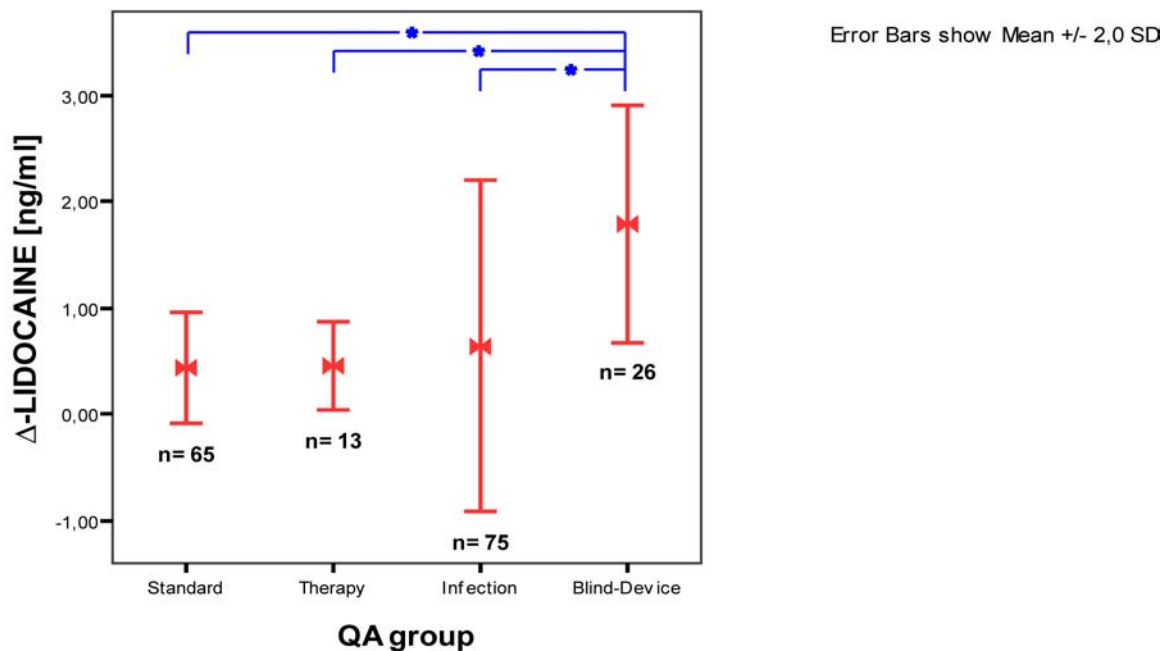


Abbildung 9: Lidocain Bolus; Das Ergebnis der ANOVA mit Turkey PostHoc Test wird hier graphisch noch einmal dargestellt: die Standard Gruppe unterscheidet sich von der „Zellfreier Bioreaktor“ Gruppe, jedoch nicht von den Gruppen „Therapie“ und „Infiziert“, da hier der Mittelwert und die Streuung zu ähnlich sind. Die * mit den horizontalen eckigen Klammern zeigen die hochsignifikanten Unterschiede.

3.1.2 MEGX

Es liegen 186 Messwerte intervallskaliert für die Differenz des 0 min und 90 min Wertes der Synthese von Monoethylglycinoxylid (Δ -MEGX) vor. Das Minimum liegt bei 0,51 $\mu\text{g/ml}$ bei einem Zellfreien Bioreaktor, das Maximum bei 727,61 $\mu\text{g/ml}$ in einem infizierten Bioreaktor, demselben, der bereits bei der Ausgangssubstanz Lidocain außergewöhnlich hohe Eliminationsraten zeigt. Die Werte zeigen im Histogramm (nicht dargestellt) eine linksschiefe Normalverteilung.

Um die Unterschiede zwischen allen Bioreaktor-Gruppen zu erfassen wurde eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt, obwohl eine Voraussetzung, die Homogenität der Varianz mit einem Levene- Wert von 16,87 und $p=0,00$, nicht gegeben ist. Im Boxplot zeigt sich auch deutlich, dass die Gruppen „Therapie“ und „Infiziert“ eine deutlich größere Variabilität haben als die übrigen Gruppen. Durch die Aufschlüsselung nach Gruppen mittels Post Hoc Turkey HSD Tests und die Anzahl der Messwerte lässt sich die Verletzung der Homogenität der Varianz aber in diesem Fall akzeptieren. Die einfaktorielle ANOVA ergab: $F(3, 182)=12,09$; $p=0,000$. Die Größenordnung des Effekts, berechnet mit Eta-Quadrat ist mit 0,17 als groß zu bewerten. Der Post Hoc Vergleich mit dem Turkey HSD Test zeigt einen signifikanten Unterschied auf dem $p<0,05$ Niveau für die Gruppen „Standard“ ($M=31,31$; $SD=48,36$) verglichen mit „Infektion“ ($M=108,70$; $SD=143,65$), sowie die Gruppen „Therapie“ ($M=98,97$; $SD=68,66$) verglichen mit „Zellfreier Bioreaktor“ ($M=1,91$; $SD=0,96$) und die Gruppe „Infektion“ ($M=108,70$; $SD=143,65$) verglichen mit „Zellfreier Bioreaktor“.

Um die Nullhypothese der Frage der Lebertypischen Leistung zu prüfen wurde eine T-Test zwischen den Gruppen „Standard“ ($M=31,31$; $SD=48,36$) und „Zellfreier Bioreaktor“ ($M=1,91$; $SD=0,96$) durchgeführt. Die Homogenität der Varianz zwischen den beiden Gruppen ist im Levene Test nicht signifikant. Der T-Test für unabhängige Stichproben mit nicht gleichen Varianzen ergab $t(71,15)=5,16$; $p=0,000$. Die Aussagekraft der Unterschiedlichkeit der Mittelwerte war moderat, berechnet mit Eta-Quadrat von 0,21.

Das Fehlerbalken- Diagramm macht auch deutlich, dass die Variabilität und der Mittelwert der Gruppe „Zellfreier Bioreaktor“ sich von allen anderen zu stark unterscheidet, da die Werte mangels Synthese lediglich durch spontanen Abbau von Lidocain oder durch Messfehler bzw. Messwerte im

Bereich der Nachweisgrenze zustande kommen. Die höheren Werte in der infizierten Gruppe kommen durch Bioreaktoren zustande, bei denen die Bakterien mit zur MEGX Synthese beigetragen haben, bei unauffälligem Stoffwechselverhalten der Bakterien kann der Verlauf durchaus im Bereich der Standardwerte liegen. Die „Therapie“ Gruppe hatte viele Proben in Plasma mit hohem Bilirubin-Spiegeln, was zu Verfälschungen des Ergebnisses führen kann¹¹⁵.

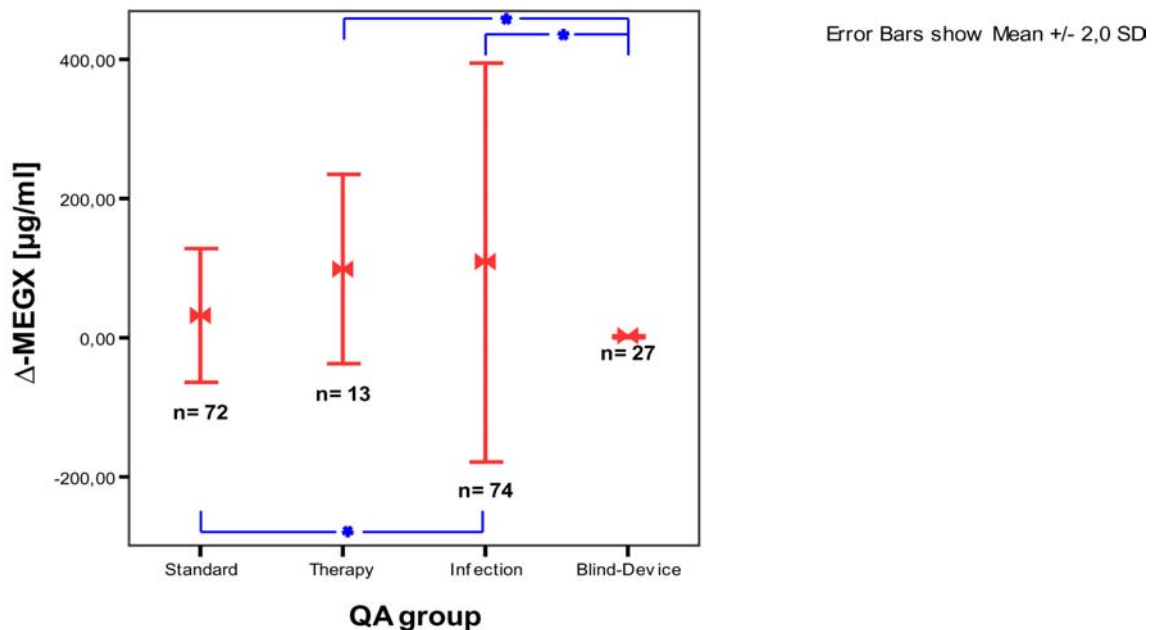


Abbildung 10: MEGX Bolus; Der * mit den horizontalen eckigen Klammern kennzeichnet hochsignifikante Unterschiede zwischen Gruppen im ANOVA Turkey HSD PostHoc Test.

3.1.3 Sorbitol

Für die Elimination von Sorbitol, Δ -Sorbitol, liegen N=188 Messwerte vor, das Maximum liegt bei einem Bioreaktor der Gruppe „Zellfreier Bioreaktor“ mit 162,20 mg/dl und das Minimum bei 3 mg/dl. Die Werte sind normalverteilt und intervallskaliert.

Um die Unterschiede in den Mittelwerten der Gruppen zu erkunden wurde wiederum eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Alle Voraussetzungen inklusive der Homogenität der Varianz wurden erfüllt. Die ANOVA ergab einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, $F(3, 184)=36,54$; $p=0,000$. Das Eta-Quadrat als Maß der Aussagekraft war 0,35, nach Cohen ein großer Effekt. Der durchgeführte Post Hoc Turkey HSD Test, der innerhalb der Gruppen die Unterschiede der Mittelwerte darstellt ergab signifikante Differenzen zwischen der Standard Gruppe ($M=58,32$; $SD=22,69$) und den Gruppen „Infiziert“ ($M=80,31$; $SD=25,27$) und „Zellfreier Bioreaktor“ ($M=110,78$; $SD=30,99$). Die Gruppe „Therapie“ ($M=46,87$; $SD=15,02$) unterschied sich signifikant von den Gruppen „Infektion“ und „Zellfreier Bioreaktor“. Außerdem unterscheidet sich die Gruppe „Infiziert“ ebenfalls von der Gruppe „Zellfreier Bioreaktor“.

Der für die Fragestellung Nullhypothese Funktion der Zellen im Bioreaktor durchgeführte T-Test basiert auf der Gleichheit der Varianz, nachgewiesen durch den Levene Test mit $F=0,001$; $p=0,971$. Der T-Test zur Überprüfung, ob sich die Mittelwerte der beiden Gruppen „Standard“ ($M=58,32$; $SD=22,69$) und „Zellfreier Bioreaktor“ ($M=110,78$; $SD=30,99$) in der Grundgesamtheit unterscheiden ergab $t(97)=-9,23$; $p=0,000$. Die Aussagekraft, berechnet mit Eta-Quadrat ist 0,47, d.h. eine mittelmäßige Chance, dass die Werte die Grundgesamtheit repräsentieren. Da der Test aber hochsignifikant ist und der Unterschied der Mittelwerte deutlich, dürfte sich in der Grundgesamtheit allenfalls die Mittelwerte in einem Maße ändern, dass keinen gravierenden Einfluss auf die Irrtumswahrscheinlichkeit des T-Tests hat.

Das Fehlerbalken- Diagramm veranschaulicht die Ergebnisse der Statistik. Die Mittelwerte der Elimination von Sorbitol, in Bezug auf die Standard Gruppe, unterscheiden sich am deutlichsten für die Gruppe „Zellfreier Bioreaktor“.

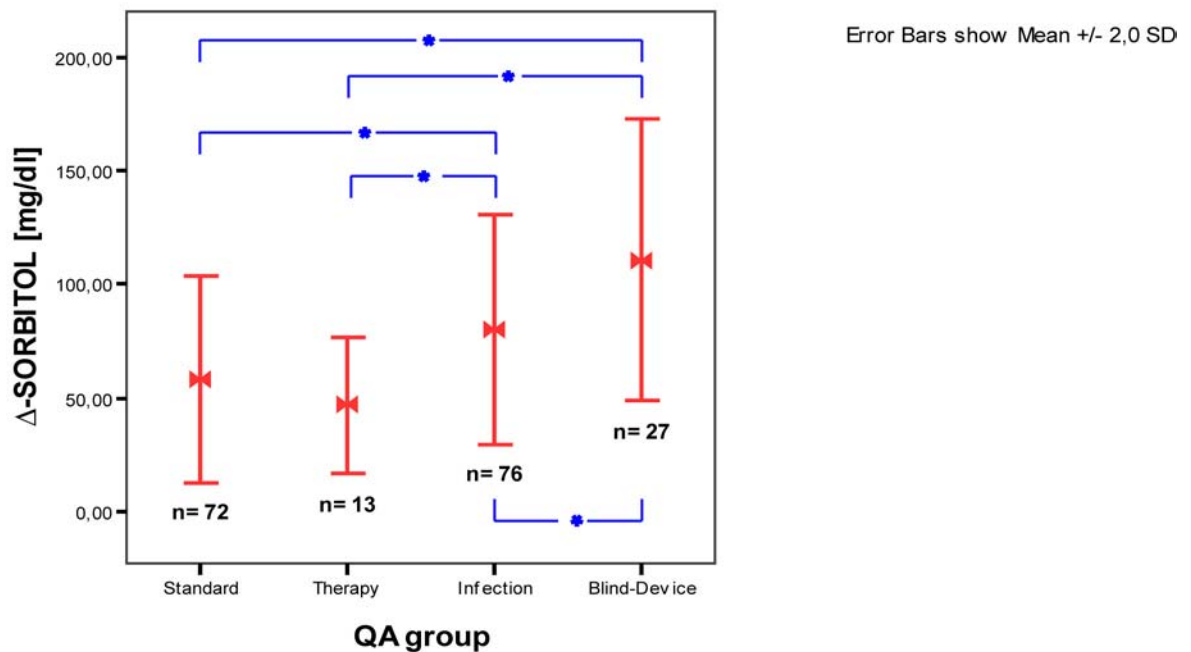


Abbildung 11: Sorbitol Bolus; Der * mit den horizontalen eckigen Klammern repräsentiert die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, nachgewiesen mittels one-way between-groups ANOVA mit Turkey HSD PostHoc Test.

3.1.4 Galactose

Die Werte für die Differenz des Messwerts 90 min abzüglich 0 min, delta-Galaktose (Δ -Galktose) sind normalverteilt. Es gibt insgesamt N=185 intervallskalierte Werte. Das Maximum liegt bei 159,40 mg/dl und das Minimum bei 7,80 mg/dl.

Die einfaktorielle ANOVA wurde mit gegebener Homogenität der Varianz, nachgewiesen mit dem Levene Test, durchgeführt. Der Vergleich der Δ -Galktose Werte ergab einen signifikanten Unterschied, $F(3, 181)=59,52$; $p=0,000$. Das Eta-Quadrat als Maß der Aussagekraft war 0,46, nach Cohen ein großer Effekt. Im Turkey HSD Test, der die Unterschiede der Mittelwerte mit Angabe der Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen berechnet zeigte sich, dass die Standard Gruppe ($M=81,92$; $SD=15,96$) sich hochsignifikant von allen anderen Gruppen unterscheidet. Die Gruppe „Therapie“ und „Infiziert“ unterscheidet sich zusätzlich noch hochsignifikant von der Gruppe „Zellfreier Bioreaktor“. Die einzelnen Gruppen mit Mittelwerten und Standardabweichung: „Therapie“ ($M=99,34$; $SD=10,10$), „Infiziert“ ($M=98,20$; $SD=11,42$) und „Zellfreier Bioreaktor“ ($M=122,89$; $SD=15,05$).

Der T-Test zwischen den Gruppen „Standard“ ($M=81,92$; $SD=15,96$) und „Zellfreier Bioreaktor“ ($M=122,89$; $SD=15,05$) basiert ebenfalls auf der Voraussetzung der Gleichheit der Varianz im Levene Test. Das Ergebnis des Independent-Sample T-Tests ist $t(95)=-11,50$; $p=0,000$. Die Aussagekraft, berechnet mit Eta-Quadrat ist 0,58, d.h. eine mittelmäßige Chance, dass die Werte die Grundgesamtheit repräsentieren. Hier gilt dasselbe wie bei Sorbitol: selbst wenn die Mittelwerte in der Grundgesamtheit etwas anders sein sollten ist praktisch kein Effekt auf die Irrtumswahrscheinlichkeit, repräsentiert durch die Signifikanz p des T-Tests zu erwarten.

Das Fehlerbalken-Diagramm zeigt die Mittelwerte und die zweifache Standardabweichung. Ausreißer und Extremwerte sind nicht dargestellt. Wieder deutlich zu sehen ist der Unterschied zwischen der „Standard“ Gruppe und „Zellfreier Bioreaktor“.

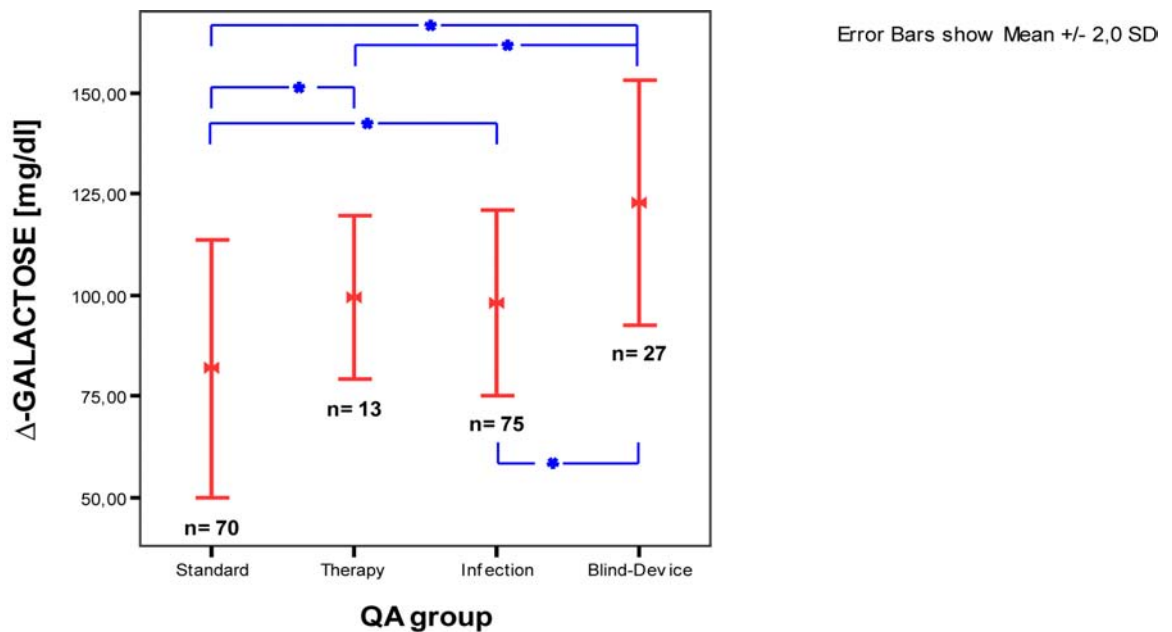


Abbildung 12: Galaktose Bolus. Das Ergebnis der ANOVA mit Turkey HSD PostHoc Test wird hier graphisch noch einmal dargestellt: die Standard Gruppe sowie die Gruppe „Zellfreier Bioreaktor“ unterscheiden sich von allen anderen Gruppen. Die * mit den horizontalen eckigen Klammern zeigen die hochsignifikanten Unterschiede.

3.1.5 Ammoniak

Für Δ -Ammonia existieren N=171 valide intervallskalierte Werte. Das Maximum liegt bei 1662 $\mu\text{mol/l}$ in einem infizierten Bioreaktor, das Minimum bei -721 $\mu\text{mol/l}$. Es gibt einige negative Werte, auch im Boxplot zu sehen, die dadurch zustande kommen, dass der Ammoniak Wert zum Zeitpunkt 90 min nach Injektion der Testsubstanz geringer ist als zum Zeitpunkt 0 min, unmittelbar vor Substanzgabe. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist, dass die Leistung der Zellen von dem Substratangebot abhängt und die Kapazität der beteiligten Enzymsysteme hoch ist und das regulär in der Zellkultur anfallende Ammoniak überschießend verstoffwechselt wird. Die Werte sind hinreichend Normalverteilt, mit einer leichten Linksverschiebung.

Die einfaktorielle ANOVA, durchgeführt mit durch Levene Test signifikant nachgewiesener Gleichheit der Varianzen ergab einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen, $F(3, 167)=24,74$; $p=0,000$. Das dazu berechnete Eta Quadrat ist 0,30; ein wiederum großer Effekt nach Cohen. Der Post Hoc Turkey HSD Test zeigt einen signifikanten Unterschied der Standard Gruppe ($M=78,06$; $SD=177,27$) sowie der „Therapie“ ($M=104,83$; $SD=319,53$) und „Infiziert“ ($M=128,67$; $SD=271,41$) Gruppe zur Gruppe „Zellfreier Bioreaktor“ ($M=519,58$; $SD=179,32$).

Der Vergleich auf Gleichheit der Mittelwerte mittels T-Test für unabhängige Stichproben ergab einen hochsignifikanten Unterschied mit $t(91)=-10,75$; $p=0,000$ für die Gruppen „Standard“ und „Zellfreier Bioreaktor“. Die Homogenität der Varianzen ist im Levene Test signifikant. Das Eta Quadrat ist 0,56, somit ist die Wahrscheinlichkeit bei 56%, dass die Daten die Grundgesamtheit repräsentieren. Aufgrund des bemerkenswerten Unterschieds der Mittelwerte ist die Signifikanz deshalb keinesfalls gefährdet.

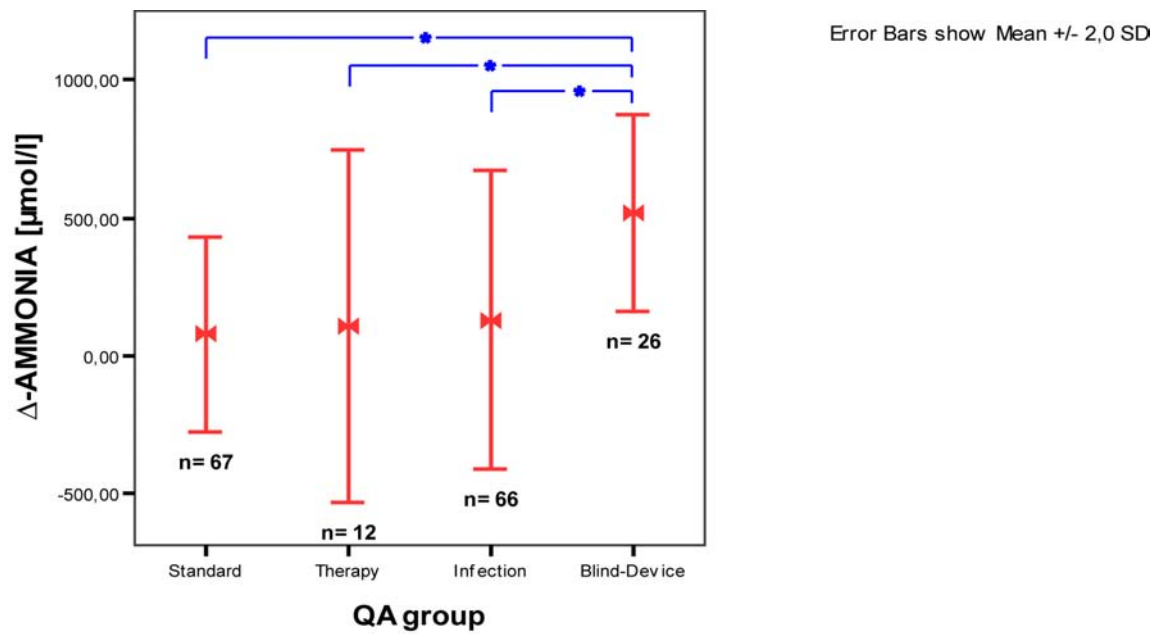


Abbildung 13: Ammoniak Bolus; Die Gruppe „Zellfreier Bioreaktor“ unterscheidet sich im one-way between-groups ANOVA mit Turkey HSD PostHoc Test von allen anderen Gruppen hochsignifikant.

3.2 Metabolische Untersuchungen – Kontinuierlicher LFT

Wie im Material und Methoden Teil bereits erwähnt wurde vom gemessenen Wert und dem Mediumleerwert jeweils die Differenz gebildet. Um eine solide Daten- Basis für die Darstellung und Auswertung der Messwerte über die Zeit als Abszissenachse zu haben wurden die 33 Kulturtage in SPSS mittels der Funktion „Variablen kategorisieren“ in 10 Gruppen aufgeteilt. Dabei bildet SPSS eine neue kategorische Variable indem es die Fälle anhand von –in diesem Fall- 10 Perzentilen aufteilt. Die neue Variable Kategorie des Kulturtags bzw. „Category of Culture Day“ umfasst in den ersten Kulturtagen nur wenige Tage zusammen, mit steigender Kulturdauer mehrere. Dies hängt mit dem Studiendesign zusammen, da in den ersten Tagen täglich Proben genommen wurden, danach nur alle 3 Tage und mit der Laufzeit der Bioreaktoren zusammen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten Abbruchkriterien erreichten oder für den klinischen Einsatz verwendet wurden, so dass die Anzahl der verfügbaren Werte mit zunehmender Kulturdauer sinkt.

Tabelle 8: Groupierung der Kulturtage in die Variable Kategorie des Kulturtags

Kategorie des Kulturtags (category of culture day)	Erster Tag	Letzter Tag	N	% of Total N
TTday 0	0	0	45	8,7%
day 1&2	1	2	75	14,5%
day 3	3	3	34	6,6%
day 4&5	4	5	62	12,0%
day 6	6	6	33	6,4%
day 7-9	7	9	68	13,2%
day 10-12	10	12	50	9,7%
day 13-16	13	16	50	9,7%
day 17-21	17	21	47	9,1%
day 22-33	22	33	53	10,3%
Total	0	33	517	100,0%

Die statistische Auswertung der Kontinuierlichen metabolischen Leberfunktionsteste beschränkt sich vor allem auf die Darstellung als Boxplots. Bei den Verläufen der einzelnen Bioreaktoren (nicht dargestellt) im Liniendiagramm zeigen sich Unterschiede zwischen den einzelnen auf jeweils einer Zellquelle, oder genauer einer porcinen Leber basierenden Zellkulturen. Diese interindividuellen Unterschiede werden durch die Darstellung der Messwerte in Kategorien nach Tagen nur bedingt durch die Streuung sichtbar. Dafür aber der typische intraindividuelle Verlauf über die Zeit mit dem Zentralwert (Median) und der Variabilität.

3.2.1 Lidocain

Lidocain stellt die Differenz des täglichen Messwerts zum ebenfalls gemessenen Mediumleerwert ($M=5,42$ ng/ml; $SD=0,46$) dar, d.h. ein Wert von Null bedeutet keinen Metabolismus. Die insgesamt 149 validen Werte sind als Boxplot mit den Kategorien der Kulturtage als Abszisse dargestellt. Der Boxplot zeigt die Quartilen als obere und untere Begrenzung der Box dar, den Median als Balken in der Mitte. Die T-förmigen Ausläufer, die „Whisker“, der Boxen sind die größten und kleinsten Werte. Kreise sind Ausreißer, im Bereich von mehr als das 1,5 fache der Boxlänge, gerechnet ab der äußeren Kante der Box.

Bereits 6 bis 12 Stunden nach der Zelleinfüllung, entspricht der Kategorie „day 0“, zeigen die Zellen eine gute Leistung mit einem Mittelwert von $4,43$ ng/ml und einer Standardabweichung von $0,29$. Der erste und zweite Tag, Kategorie „day 1&2“, verhalten sich ähnlich. In diesen ersten drei Tagen ist die Mediumzufuhr noch höher, außerdem befinden die Zellen sich dabei noch in Reorganisation. Es folgt im weiteren Kulturverlauf eine Steigerung mit dem Höhepunkt in Kategorie „day 10-12“, mit einem Mittelwert $M=4,99$ ng/ml und einer Standardabweichung von $0,23$. In den Kategorien „day 13-16“ ($M=4,98$ ng/ml; $SD=0,26$), „day 17-21“ ($M=4,17$ ng/ml; $SD=1,47$) und „day „22-33“ ($M=3,94$ ng/ml; $SD=0,91$) fallen die Werte wieder etwas ab, jedoch wird auch die Streubreite größer. Dies, sowie die Ausreißer und Extremwerte nach unten, ist eine Folge von einem Teil der Bioreaktoren,

die durch verschiedene Ursachen wie der Beginn der Durchführung von Oxygenierungs- und Hypothermiestudien¹¹⁶ ab dem Tag 18 zu einem Ende der regulären Stand-By Periode gebracht wurden. Andere Bioreaktoren, bei denen das reguläre Stand-By Standardprotokoll aufrechterhalten wurde, liefen auch noch nach über 30 Tagen mit Umsatzraten über 4 ng/ml Lidocain.

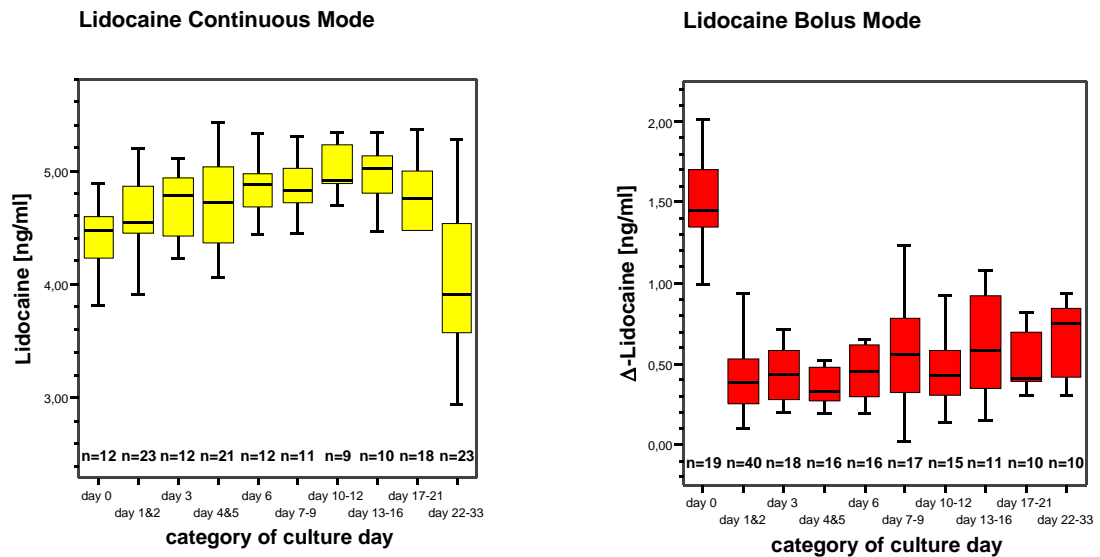


Abbildung 14: Lidocain, gruppiert nach Kategorien der Kulturtage; links mit gelben Boxplots Kontinuierlicher Modus, rechts mit roten Boxplots zum Vergleich Bolus Modus

Der Vergleich der kontinuierlichen Lidocain Ergebnisse zu den Bolus Werten wird wegen den Unterschiedliche Messmethoden und der daraus resultierende unterschiedlichen Interpretation der Ergebnisse lediglich zu einem Vergleich des Verlaufs über die Zeitachse. Während bei der Bolus Methode die Bolus Werte aus der Differenz des gemessenen Wertes bei 90 min und des Ausgangswertes bei 0 min errechnet wurden (s. Kapitel 2.3.1) wurde bei den kontinuierlichen Lidocain Untersuchungen die Konzentration der Substanz als Fließgleichgewicht gemessen und die Differenz zur Ausgangskonzentration im Medium gebildet (s. Kapitel 2.3.2). Bei den kontinuierlichem Modus repräsentieren höhere Werte eine größere Elimination der Substanz, bei dem Bolus Modus repräsentieren niedrigere Werte eine höhere Elimination der Substanz. Der Tag 0 unterscheidet sich ebenfalls: bei der Bolus Methode wurde am Tag 0 der Wert im Zellfreien Bioreaktor gemessen und bei der kontinuierlichen Methode der Wert mit Zellen nach 6 und 12 Stunden.

Der Verlauf über die Zeitachse ist bei beiden Testmethoden ähnlich, bei den Bolus Tests wurde allerdings das reguläre Stand- By Protokoll zum Bioreaktor Betrieb bis zum Erreichen von Abbruchkriterien der Zellkulturen aufrecht erhalten, deshalb ist der Leistungsabfall über dem 21 Kulturtage wesentlich milder. Ausreißer, Extremwerte und große Unterschiede in der Variabilität zwischen den Kategorien der Kulturtage lassen sich fast alle bei Betrachtung der Einzelverläufe der Zellkulturen durch individuelle Ereignisse erklären.

3.2.2 MEGX

Bei MEGX ist der Mediumleerwert 0, es wird kein MEGX beigelegt und im Medium auch nicht Synthetisiert. Deshalb sind die direkt gemessenen Synthesewerte (N=151) gezeigt. Der Trend im Verlauf ist in der Mitte und am Ende dem von Lidocain ähnlich, am Anfang, an Tag 0, Kategorie „day 0“ jedoch am höchsten mit einem Mittelwert von 62,37 $\mu\text{g/ml}$ und einer Standardabweichung von 49,76. Dem folgt ein Abfallen der Mittelwerte bis Kategorie „day 3“ (M=24,58 $\mu\text{g/ml}$; SD=29,93). Die Mittelwerte steigen jedoch wieder an, bis Kategorie „day 6“ (M=52,30 $\mu\text{g/ml}$; SD=24,08), Kulturtage 13 bis 17. Dann folgt ein weiterer kontinuierlicher Abfall bis Kategorie „day 22-33“ (M=21,00 $\mu\text{g/ml}$; SD=24,80). Die Zunahme der Streubreite ist sicherlich eine teilweise Verzerrung der Werte durch Hypothermieintervalle und Beendigung des regulären Stand- By Betriebs nach dem 18. Kulturtage. Bei MEGX auffällig sind zahlreichen Ausreißer und Extremwerte, sowie die große Varianz. Die wahrscheinlichste Ursache dafür sind größere Intra- und

Interindividuelle Schwankungen, die noch ausgeprägter bei den Bolus Tests mit MEGX zu beobachten waren.

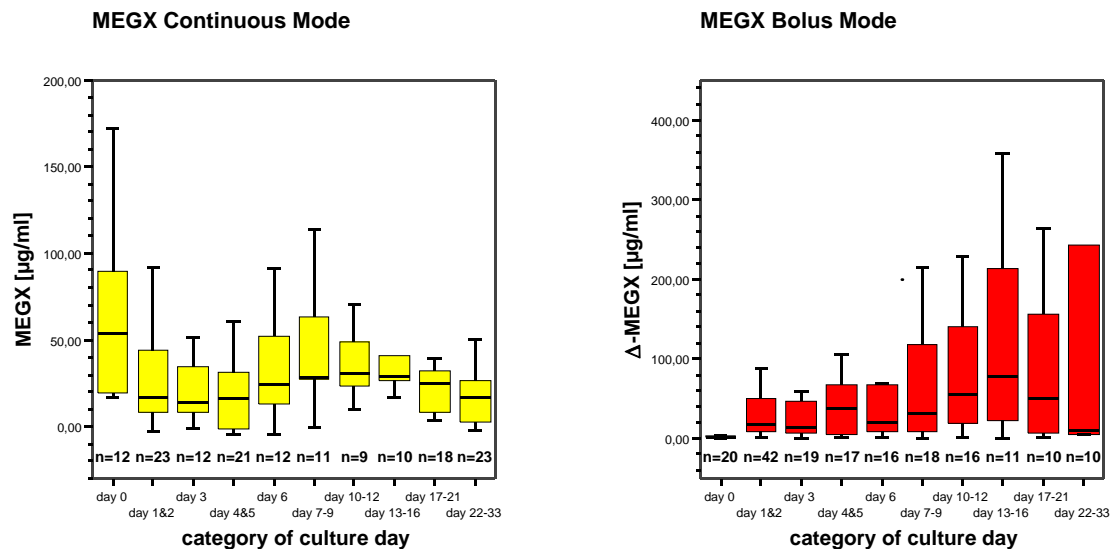


Abbildung 15: MEGX, gruppiert nach Kategorien der Kulturtage; links mit gelben Boxplots Kontinuierlicher Modus, rechts mit roten Boxplots zum Vergleich Bolus Modus

Zum Vergleich ist der Verlauf von MEGX über die Kategorien der Kulturtage im Bolus Modus dargestellt. Beim Bolus Protokoll wurden am Tag 0 die Werte im Zellfreien Kultursystem bestimmt. An den folgenden Tagen wurde der gemessene MEGX Synthesewert 90 min nach der Bolus-Injektion von Lidocain von dem MEGX Wert 0 min vor dem Bolus subtrahiert. In beiden Fällen repräsentieren höhere Werte eine größere Synthese. Der Median von MEGX im Bolus Modus hat einen zweigipfeligen Verlauf. Außerdem ist eine auffällige Zunahme der Streubreite mit steigender Kulturdauer zu beobachten.

3.2.3 Sorbitol

Der Sorbitol Boxplot stellt wieder den Unterschied zwischen täglich gemessener Sorbitol Konzentration und dem Mediumleerwert ($M=175,8 \text{ mg/dl}$; $SD=1,84$) dar. Am Tag 0 ($M=137,7 \text{ mg/dl}$; $SD=11,18$) und Kategorie „day 1&2“ ($M=151,01 \text{ mg/dl}$; $SD=11,63$) erreicht die Zellkultur bereits recht hohe Werte in der Elimination von Sorbitol. Bis zum größten Mittelwert in der Kategorie „day 10-12“ ($M=153,48 \text{ mg/dl}$; $SD=22,66$), pendeln die Werte großteils im Bereich von 148 bis 154 mg/dl . In Kategorie „day 17-21“ ($M=94,54 \text{ mg/dl}$; $SD=69,25$) und Kategorie „day 22-33“ ($M=69,34 \text{ mg/dl}$; $SD=54,63$) fällt der Mittelwert ab. Das Maximum in Kategorie „day 17-21“ ist bei 132,3 mg/dl , das Maximum in Kategorie „day 22-33“ ist bei 156,9 mg/dl und wurde in einem im regulären Stand-By Betrieb laufenden Bioreaktor gemessen. Der Abfall der Mittelwerte und die größere Varianz in den Kulturtagen über 18 Tage ist wie bei den anderen Test-Substanzen im Kontinuierlichen Modus vor allem durch Hypothermie- und Begasungsversuche oder andere Manipulationen jenseits des regulären Stand-By Protokolls zu erklären.

Der Vergleich der Elimination von Sorbitol zwischen Kontinuierlichem und Bolus Modus ist von der Interpretation ähnlich wie bei Lidocain. Beim Kontinuierlichen Modus repräsentieren höhere Werte eine größere Elimination, beim Bolus Modus stellen niedrigere Werte eine höhere Elimination dar und der Tag 0 Wert beim Bolus Modus ist wieder im zellfreien Kultursystem gemessen. Der Verlauf der Sorbitol Elimination über die Zeitachse ist bei beiden Testmodi unterschiedlich: während beim Kontinuierlichen Testschema ein Anstieg der Elimination von Tag 0 bis Tag 3 stattfindet gefolgt von einer stabilen Plateauphase bis zur Kategorie „day 13-16“, der letzten Kategorie mit Einhaltung des regulären Stand-By Protokolls. In den weiteren Kategorien, die die Kulturtage 17-33 wiedergeben, folgt ein Abfallen des Medians und eine Zunahme der Streubreite, wie bereits bei Lidocain gesehen. Bei den Bolus Tests wurde das reguläre Stand-By Protokoll über die gesamte dargestellte Zeitachse aufrechterhalten.

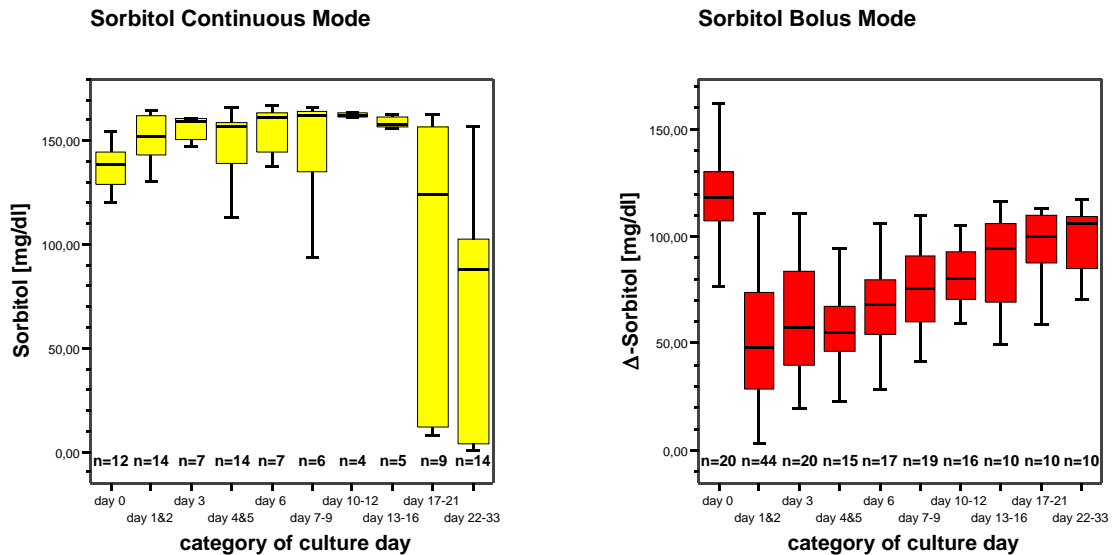


Abbildung 16: delta-Sorbitol, gruppiert nach Kategorien der Kulturtage; links mit gelben Boxplots Kontinuierlicher Modus, rechts mit roten Boxplots zum Vergleich Bolus Modus

Bei den Bolus Werten ist am Anfang der Kulturphase bis Tag 3 eine geringfügig größere Streubreite zu sehen, der Median der Elimination bewegt sich allerdings kontinuierlich über die gesamte Kulturdauer langsam in den Bereich höherer Werte, d.h. es wird mit zunehmender Kulturdauer weniger Sorbitol innerhalb der 90 min zwischen Injektion und Messung metabolisiert.

3.2.4 Galaktose

Für Galaktose wurde wieder die Differenz zwischen gemessenem Wert und Mediumleerwert ($M=100,1$ mg/dl; $SD=1,84$) gebildet. Am Tag 0, Kategorie „day 0“ erreicht Galaktose einen Mittelwert von 48,86 mg/dl mit einer Standardabweichung von 9,74. In der Kategorie „day 1&2“ ($M=60,99$ mg/dl; $SD=13,14$), Kategorie „day 3“ ($M=66,85$ mg/dl; $SD=13,59$), gehen die Werte stufenweise nach oben- mit Ausnahme von „day 4&5“ und erreichen in Kategorie „day 10-12“ ihren höchsten Mittelwert mit 91,05 md/dl und der Standardabweichung von $SD=1,98$.

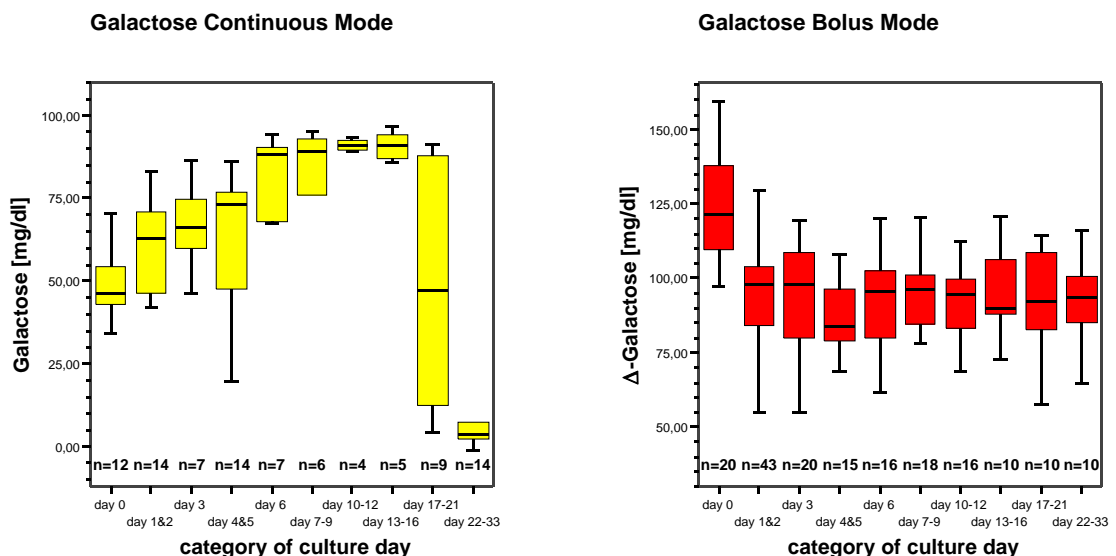


Abbildung 17: Galaktose, gruppiert nach Kategorien der Kulturtage; links mit gelben Boxplots Kontinuierlicher Modus, rechts mit roten Boxplots zum Vergleich Bolus Modus

Die Kategorie „day 4&5“ bildet in allen Testsubstanzen eine Ausnahme, am deutlichsten allerdings

bei Galaktose, da in dieser Zeit mehrere Zellkulturen Abbruchkriterien erreichten. Kategorie „day 13-16“ ist auf vergleichbar hohem Niveau ($M=90,84$ mg/dl; $SD=4,60$). Ab Kategorie „day 17-21“ ($M=51,82$ mg/dl; $SD=35,78$) gehen die Mittelwerte durch die für manche Reaktoren durchgeführten Änderungen im Protokoll und somit Kulturverlauf auf geringere Werte zurück. Wie bereits bei Sorbitol, Lidocain und MEGX besprochen steigt deshalb auch die Variabilität erheblich an. Kategorie „day 22-33“ weist nur noch einen Mittelwert von $13,66$ mg/dl bei einer Standardabweichung von $25,50$ auf. In dieser Kategorie fallen allerdings viele Werte unter Bedingungen jenseits des regulären Stand-By Protokolls, das Maximum in einem mit regulärem Stand-By Protokoll betriebenen Bioreaktor beträgt $96,6$ mg/dl.

Der Vergleich des Verlaufs über die Kulturdauer zwischen der Kontinuierlichen und der Bolus Methode ist Sorbitol ähnlich. Am Anfang folgt allerdings ein langsamerer Anstieg bei dem Kontinuierlichen Modus, die Plateauphase wird später erreicht, die Bioreaktoren mit den Abbruchkriterien am Tag 4&5 (s.o.) beeinflussen den Median und Mittelwert stärker als bei den anderen Parametern. Bei den Bolus Messwerten ist eine Kontinuität über die gesamte Kulturdauer zu beobachten.

3.3 Syntheseparameter

Die Syntheseparameter Pig-Albumin, Ammoniak Basal, Lactat und Harnstoff wurden im Rahmen der metabolischen Bolus Untersuchungen gemessen. Die Darstellung erfolgt über den bei den Kontinuierlichen LFT bereits verwendeten Kategorien der Kulturtage und über Kulturphasen. Ähnlich wie bei der Enzym- Freisetzung¹¹⁷ wurden die Syntheseparameter in Phasen des Zellkulturverlaufs eingeteilt. Die Phasen sind:

Tabelle 9: Übersicht Kultuphasen

Phase	Kurzbezeichnung	Beschreibung
P0	blind device	Tag 0, Zelleinfüllung
P1	initial	Tag 1 bis 3, Initiale Adhäsions- und Reorganisationsphase der Zellkultur
P2	stable	Tag 4 bis 14, stabile Kulturphase
P3	extended	Tag 15 und folgende, erweiterte Phase, über die Zeitachse langsames Nachlassen der Funktion

Da die Syntheseleistung von Zellen zu den hochdifferenzierten Aufgaben zählt sind die Syntheseparameter interessant für die Fragestellung der Nutzbarkeitsdauer und Reproduzierbarkeit der Zellkultur.

3.3.1 Pig-Albumin

Pig-Albumin wird von den Zellen zum Teil synthetisiert, zum Teil wird es von apoptotischen Zellen freigesetzt. Diese Summe aus Synthese und Freisetzung wird als Liberation zusammengefasst gemessen. Es liegen N=155 Messwerte vor. Die Werte sind linksverschoben Normalverteilt.

Die Liberation von Pig-Albumin verhält sich im Zeitlichen Verlauf etwas anders als die metabolischen Testsubstanzen. An Tag 1, sind die Werte am höchsten, Mittelwert 243 mg/l, Standardabweichung 298. Neben dem initialen Hoch, welches vor allem auf der Freisetzung von Albumin durch geschädigte Zellen beruht, gibt es ein stabiles Plateau bis Tag 14. Danach fällt die Pig- Albumin Synthese wieder leicht ab, wobei nach Tag 21 das Standard Stand-By Protokoll nicht verlassen wurde.

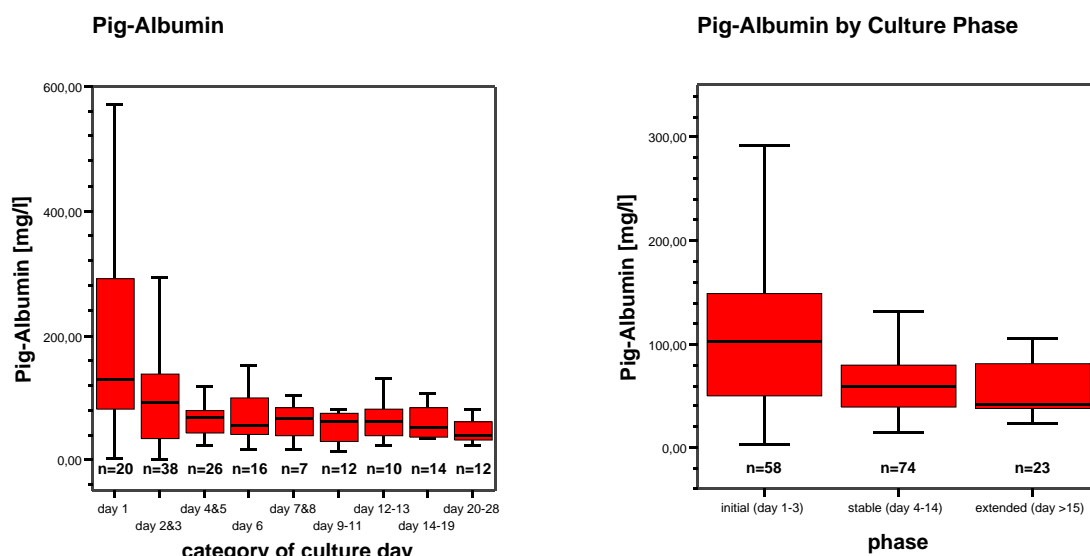


Abbildung 18: Pig-Albumin, groupiert nach a) Kategorien der Kulturtage und b) nach Kulturphasen

Die Darstellung nach den Kulturphasen fasst den Verlauf kompakter zusammen als die Darstellung über die Kategorien der Kulturtage.

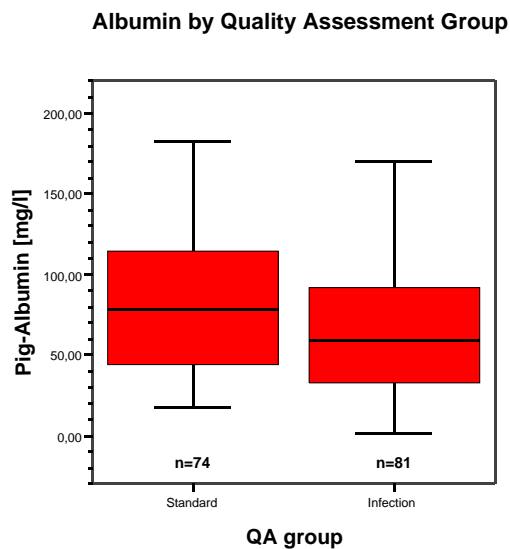


Abbildung 19: Pig-Albumin, gruppiert nach Qualitätskriterium Standard und Infektion

Um auf die Frage der Qualitätssicherung einzugehen wurden die Gruppen Standard (M=; SD=) und Infektion (M=; SD=) für Pig-Albumin mittels T-Test für unabhängige Stichproben verglichen. Im Levene Test wurde die Gleichheit der Varianzen angenommen, der dazugehörige T-Test brachte mit $t(153)=0,735$; $p=0,464$ keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen zum Vorschein. Pig-Albumin ist als Parameter um eine Infektion zu detektieren nicht geeignet.

3.3.2 Ammoniak Basal

Der Ammoniak Spiegel der Zellkultur ohne Bolus Belastung ist Ammoniak Basal bzw. Ammonia Base Level. Insgesamt liegen 253 Messwerte vor. Die Werte sind linksverschoben Normalverteilt.

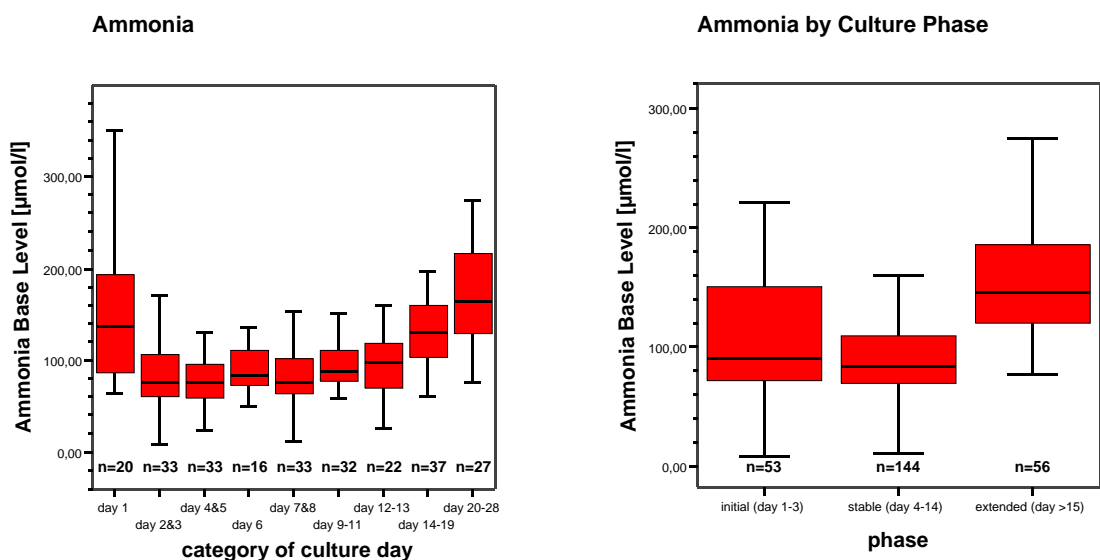


Abbildung 20: Ammoniak Basal, gruppiert nach a) Kategorien der Kulturtage und b) nach Kulturphasen

Den geringsten Mittelwert hat die stabile Kulturphase (Tag 4 bis 14), den höchsten die Kulturphase jenseits des 14 Tages. Am Tag 1 ist der Median ebenfalls über den der stabilen Kulturphase. Der

Boxplot mit den Phasen stellt die Ergebnisse des Boxplots über die Kategorien der Kulturtage kompakter dar.

Ammoniak ist ein wichtiger Parameter für Hepatozytenkulturen, er reflektiert eine Lebertypische Leistung und kann zur Beurteilung der nutzbaren Kulturdauer der Zellkultur herangezogen werden.

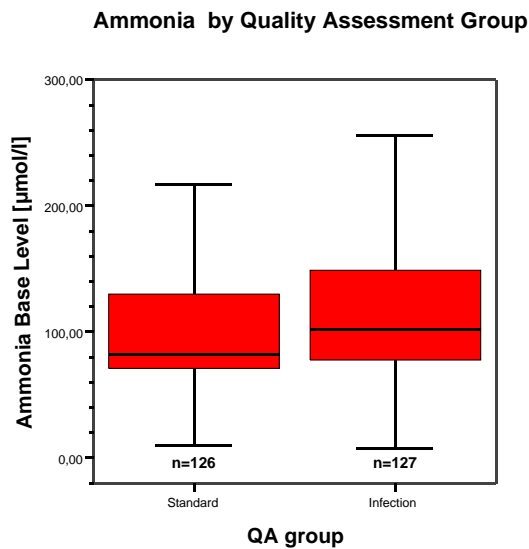


Abbildung 21: Ammoniak Basal, gruppiert nach Qualitätskriterium Standard und Infektion

Im T-Test für unabhängige Stichproben ergab sich zwischen den Gruppen Standard ($M=114,06 \mu\text{mol/l}$; $SD=124,31$) und Infiziert ($M=182,29 \mu\text{mol/l}$; $SD=404,49$) mit $t(149,8)=-1,82$ und $p=0,071$ kein signifikanter Unterschied. Gleiche Varianzen wurden im Levene Test zurückgewiesen.

Ausreißer und Extremwerte über $1000 \mu\text{mol/l}$ sind bei infizierten Zellkulturen vorgekommen. Werte über $500 \mu\text{mol/l}$ ohne plausible Erklärung sind immer ein dringender Hinweis auf eine Infektion.

3.3.3 Harnstoff

Harnstoff wurde wie Ammoniak in Phasen des Kulturverlaufs eingeteilt. Insgesamt liegen $N=268$ Messwerte vor. Die Werte sind gut normalverteilt.

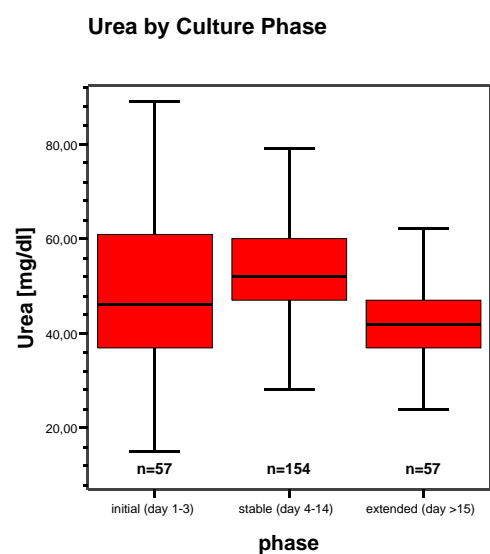
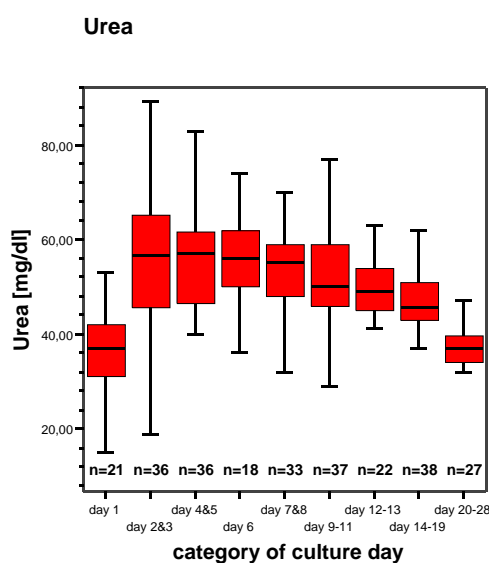


Abbildung 22: Harnstoff, gruppiert nach a) Kategorien der Kulturtage und b) nach Kulturphasen

Die höchsten Mittelwerte liegen für die stabile Kulturphase von Tag 4 bis 14 vor. Die Mittelwerte in der Adhäsionsphase von Tag 1 bis 3 sind nur geringfügig darunter. Nach Tag 14 fällt der Mittelwert ab, vor allem jenseits der 25 Tage Kulturdauer (nicht dargestellt).

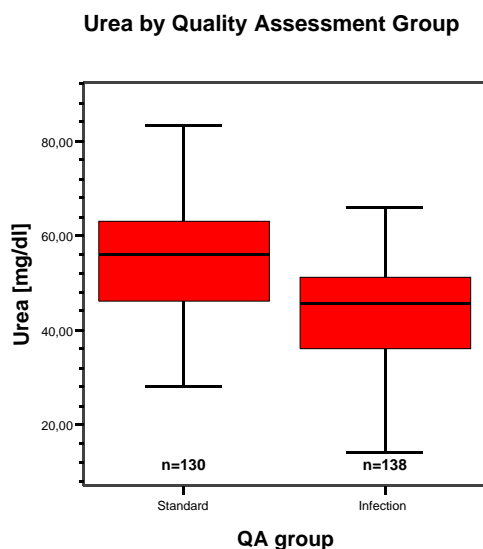


Abbildung 23: Harnstoff, gruppiert nach Qualitätskriterium Standard und Infektion

Der T-Test für unabhängige Stichproben mit im Levene test nachgewiesener Gleichheit der Varianz zwischen den Qualitäts- Gruppen Standard ($M=54,60$ mg/dl; $SD=11,50$) und Infektion ($M=42,65$ mg/dl; $SD=12,69$) ergab $t(266)=8,06$, $p=0,000$, d.h. einen hochsignifikanten Unterschied. Da die Differenz der Mittelwerte lediglich 9,03 beträgt ist der praktische Nutzen von Harnstoff bei der Detektion von Infektionen gering.

3.3.4 Lactat

Für Lactat liegen N= Messwerte vor. Die Werte sind linksschief Normalverteilt.

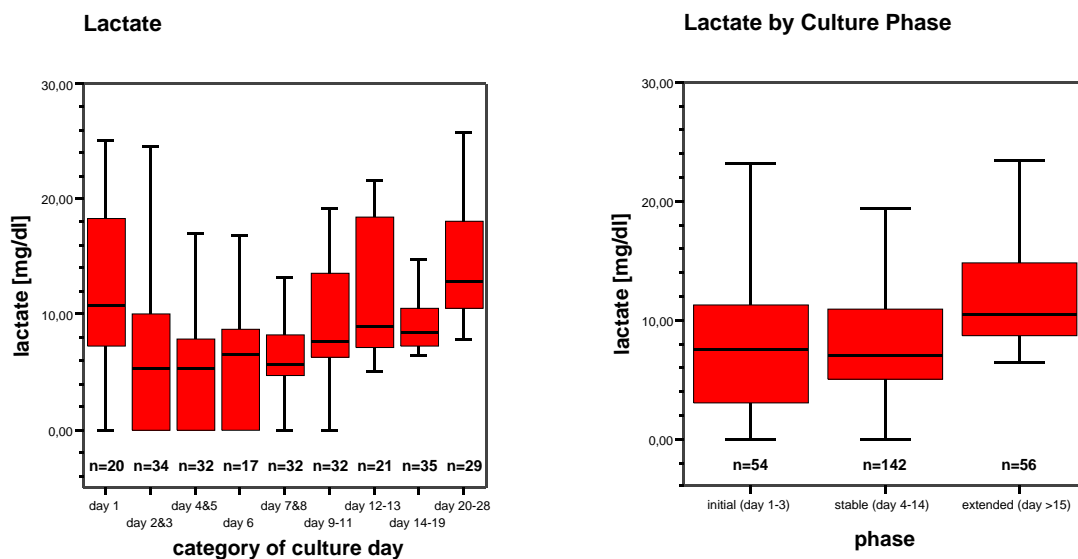


Abbildung 24: Lactat, gruppiert nach a) Kategorien der Kulturtage und b) nach Kulturphasen

Im Verlauf verhält sich Lactat ähnlich den anderen Syntheseparametern. An Tag 1 ist der Median

hoch und die Varianz groß, dann folgt eine weitgehend stabile Kulturphase bis Tag 14 und ein dezenter Anstieg der Werte über 2 Wochen Kulturverlauf.

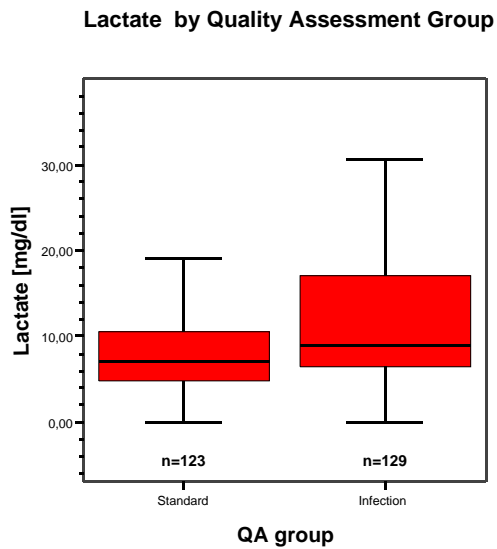


Abbildung 25: Lactat, gruppiert nach Qualitätskriterium Standard und Infektion

Der T-Test für unabhängige Stichproben zwischen den Gruppen Standard und Infektion findet für die Gruppen Standard und Infektion einen signifikanten Unterschied ($\alpha=0,05$), mit $t(149,5)=-2,47$ und $p=0,015$. Die Differenz der Mittelwerte beträgt lediglich -7,12, was Lactat ähnlich wie Harnstoff zu keinem eindeutigen Parameter macht um Infektionen zu diskriminieren.

3.4 Kinetik der Testsubstanzen im zellfreien Bioreaktorsystem

Um den Einfluss der Verteilung und der Adsorption sowie spontaner Zerfall und ähnliche Fehlergrößen abschätzen zu können wurde die Kinetik der Testsubstanzen im Schema der metabolischen Bolus Leberfunktionsteste im zellfreien Gerät gemessen.

3.4.1 Lidocain

Die Kinetik von Lidocain wurde in N=9 zellfreien Bioreaktoren gemessen. Die Tabelle gibt die Mittelwerte und Standardabweichung zu den Analytikzeitpunkten 0, 30, 60 und 90 min wieder.

Tabelle 10: Kinetik von Lidocain, Bolus Schema im zellfreien Bioreaktor

Zeitpunkt	Mittelwert (mg/l)	SD
0 min	0,01	0,01
30 min	2,29	0,66
90 min	1,91	0,47
180 min	1,86	0,44

Das auf diesen Mittelwerten basierende Liniendiagramm zeigt die Kinetik graphisch, die Ausläufer der Messwerte nach oben und unten zeigen die Standardabweichung. Die Kinetik von Lidocain ist der von Phenolrot sehr ähnlich (unpublizierte Ergebnisse). Die höchste Konzentration wurde nach 30 min, dem ersten Zeitpunkt, gemessen, bei Phenolrot ist das Maximum bereits bei etwas über 10 min erreicht. Danach sieht man einen Abfall der Konzentration im Bioreaktorkreislauf durch Verteilungsphänomene zwischen den Bioreaktor- Kompartimenten Pumpenschlauch und Membranbündel und dem Zellkompartiment. Zwischen 30 und 60 min ist der Abfall steiler als zwischen 60 und 90 min, was auf eine einsetzende Sättigung der Konzentration in allen Kompartimenten hindeutet.

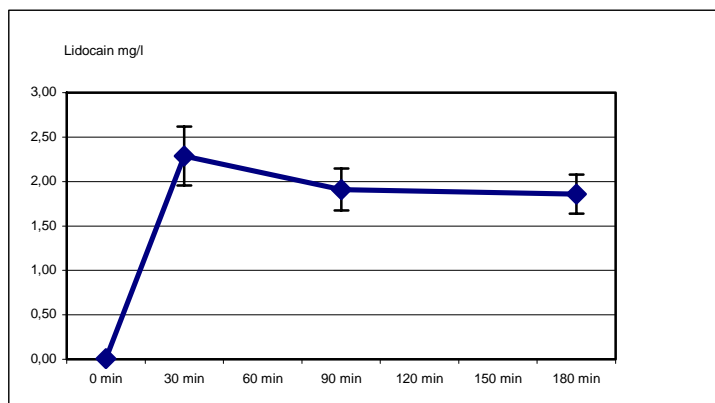


Abbildung 26: Kinetik von Lidocain, Bolus Schema im zellfreien Bioreaktor

3.4.2 MEGX

Die Kinetik von MEGX wurde analog zu der von Lidocain in 9 Bioreaktoren ohne Zellen gemessen. Die Werte befinden sich am Detektionslimit des verwendeten IFP Assay von Abbott. Sie kommen vor allem wahrscheinlich durch spontanen Zerfall von Lidocain zustande oder durch Kreuzreaktion des Tests mit Lidocain.

Tabelle 11: Kinetik von MEGX, Bolus Schema im zellfreien Bioreaktor

Zeitpunkt	Mittelwert (µg/ml)	SD
0 min	1,85	0,96
30 min	4,35	2,11
90 min	4,25	2,00
180 min	4,89	1,81

Die graphische Darstellung zeigt den 0 min Leerwert am Detektionslimit des verwendeten Testkits. Die Werte für 30, 60 und 90 min zeigen einen Verlauf, der durch die Verteilung und spontanen Zerfall von Lidocain sowie Kreuzreagibilität des Tests bestimmt ist.

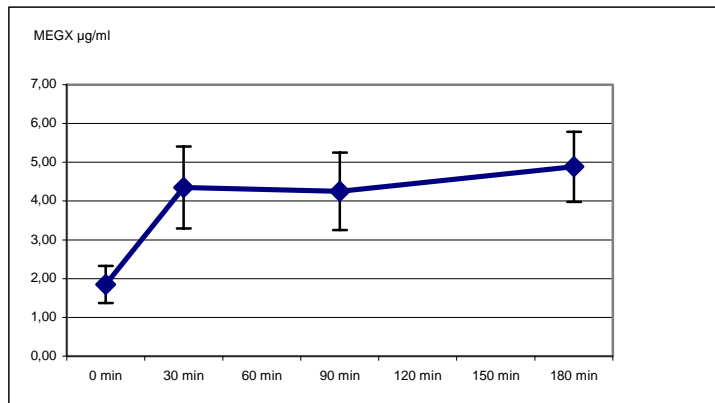


Abbildung 27: Kinetik von MEGX, Bolus Schema im zellfreien Bioreaktor

3.4.3 Sorbitol

Die Kinetik von Sorbitol wurde wie bei den anderen Testsubstanzen gemessen. Im Wesentlichen zeigt der Verlauf eine schnelle Aufsättigung und einen sehr geringen Abfall.

Tabelle 12: Kinetik von Sorbitol, Bolus Schema im zellfreien Bioreaktor

Zeitpunkt	Mittelwert (mg/dl)	SD
0 min	0,00	0,00
30 min	144,10	13,17
60 min	143,22	14,12
90 min	143,60	18,24
180 min	143,48	12,83

Sorbitol wird rasch gleichmäßig verteilt und bleibt im zellfreien geschlossenen rezirkulierenden System, d.h. keine frische Mediumzufuhr, auf einem konstanten Niveau über 180 min.

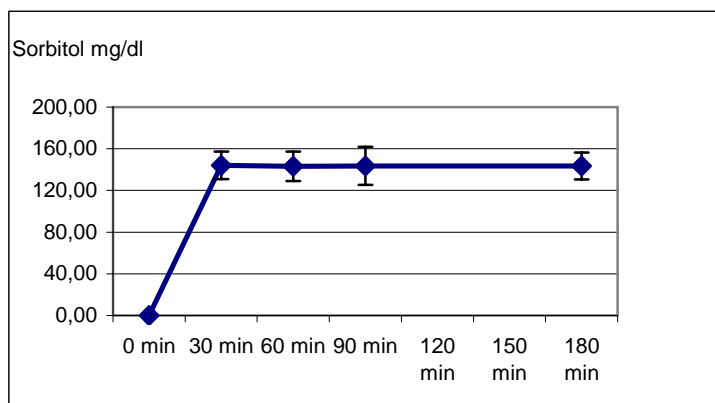


Abbildung 28: Kinetik von Sorbitol, Bolus Schema im zellfreien Bioreaktor

3.4.4 Galaktose

Galaktose hat eine ähnliche Kinetik wie Sorbitol. Galaktose hat allerdings bereits bei 0 min einen Mittelwert von 41 mg/dl, da das Medium es in dieser Konzentration (40 mg/dl \pm 5 %) als Bestandteil

enthält, welcher die Versorgung der Zellen mit verschiedenen Kohlenhydraten gewährleistet.

Tabelle 13: Kinetik von Galaktose, Bolus Schema im zellfreien Bioreaktor

Zeitpunkt	Mittelwert (mg/dl)	SD
0 min	41,38	3,07
30 min	166,60	12,89
60 min	166,48	14,83
90 min	166,42	15,74
180 min	167,07	15,61

Das Zeitverlauf- Konzentration- Diagramm für Galaktose zeigt den raschen Anstieg vom Mediumbasiswert zu den Bolus Konzentrationen in den ersten 30 min. Die Konzentration bleibt dann über 3 Stunden fast konstant.

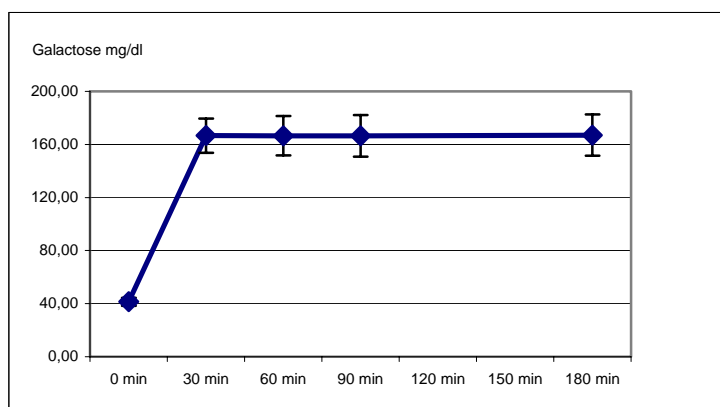


Abbildung 29: Kinetik von Galaktose, Bolus Schema im zellfreien Bioreaktor

3.4.5 Ammoniak

Ammoniak hat eine eigene Kinetik. Im Medium befindet sich bereits gemessen ein geringer Ammoniak Spiegel von 59,7 $\mu\text{mol/l}$. Durch Zugabe des Bolus von 750 $\mu\text{mol NH}_4\text{Cl}$ erreicht die Ammoniak Konzentration nach 30 min einen Mittelwert von 652 $\mu\text{mol/l}$. Dieser bleibt auf diesem hohen Wert bis 90 min und fällt dann auf durchschnittlich 629 $\mu\text{mol/l}$ nach 180 min ab.

Tabelle 14: Kinetik von Ammoniak, Bolus Schema im zellfreien Bioreaktor

Zeitpunkt	Mittelwert ($\mu\text{mol/l}$)	SD
0 min	59,67	12,01
30 min	652,11	107,84
60 min	654,22	99,04
90 min	648,11	85,56
180 min	629,00	57,79

Die Kinetik von Ammoniak ist charakterisiert durch eine schnelle Aufsättigung und ein langsames Abfallen, wie in dem Liniendiagramm veranschaulicht.

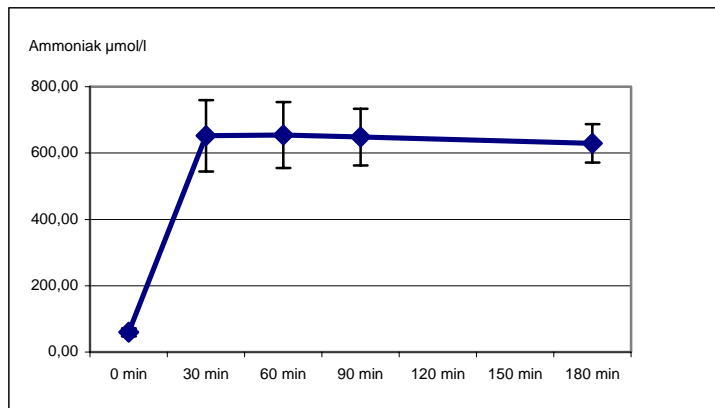


Abbildung 30: Kinetik von Ammoniak, Bolus Schema im zellfreien Bioreaktor

4 Diskussion

4.1 Metabolische Untersuchungen

Wie in der Aufgabenstellung der Arbeit bereits erläutert steht die Suche nach geeigneten Methoden zur Routinemäßigen Bewertung und Qualitätssicherung von dynamischen Leber- Zellkulturen in Bioreaktoren im Vordergrund dieser Arbeit. Außerdem ist mit den Ergebnissen eine Aussage zum Wirksamkeitsnachweis des Bioreaktors mit der Hypothese „der Bioreaktor ermöglicht lebertypische Leistungen“ möglich, beziehungsweise zum Zurückweisen der dazugehörigen Nullhypothese „der Bioreaktor ermöglicht keine lebertypische Leistungen“. Die untersuchten Protokolle für die quantitativen metabolischen Tests haben in der Praktikabilität Vor- und Nachteile. Die auf dem Bolus Prinzip basierenden Tests sind von einem Fließgleichgewicht und der damit verbundenen kontinuierlichen Mediumzufuhr unabhängig, sie lassen sich deshalb auch unmittelbar nach einem Therapie Einsatz zur Bewertung der Zellfunktion einsetzen. Die kontinuierlichen metabolischen Tests sind weniger Arbeitsintensiv, da nur einmal täglich eine Probe genommen werden muss, und weniger belastend für die Zellen, da sie ohne 90 min Rezirkulation des Bioreaktorkreislaufs auskommen. Des Weiteren weniger anfällig für Fehler bei der Mischung und Gabe der Testsubstanzen, da diese bereits beim Hersteller des Mediums zugesetzt werden können.

Ein Vergleich mit Werten der bestehenden Literatur, die sich zumeist auf klinische Studien in vivo bezieht ist bei den meisten Substanzen aufgrund der unterschiedlichen Kinetik schwierig.

4.1.1 Lidocain

Die Ergebnisse der verschiedenen Studien zu Lidocain haben verschiedene Aussagen, zu unterschiedlichen Zielen der Arbeit. Die Ergebnisse der Bolus Versuche eignen sich Aufgrund der Groupierung in Standard, Therapie, Infiziert und Zellfreier Bioreaktor zur Charakterisierung. Bei Lidocain zeigte sich im Post Hoc Test der ANOVA lediglich ein Unterschied von der Gruppe Zellfreier Bioreaktor zu den restlichen Gruppen. Die Standard Gruppe kann aber für die Charakterisierung der typischen Stoffwechselleistung herangezogen werden. Durch eine scharfe Abgrenzung zu der Gruppe „Zellfreier Bioreaktor“ ist es möglich z.B. durch Definition der 80% Perzentile ein Qualitäts- und Freigabekriterium für Therapieeinsätze zu schaffen. Der T-Test zwischen der Standard und der Gruppe „Zellfreier Bioreaktor“ zeigte einen hochsignifikanten Unterschied, was zur Untermauerung der Hypothese „der Bioreaktor ermöglicht Lebertypische Leistung“ bzw. zum Zurückweisen der Nullhypothese „der Bioreaktor ermöglicht keine Lebertypische Leistung“ dient. Lidocain ist als Parameter um Infektionen zu detektieren bei individuellen Bakterienstämmen nur indirekt nützlich, Veränderungen um über 10% mehr Stoffwechselleistung im Verlauf zweier Tage sind jedoch immer als verdächtig einzustufen. Veränderungen, die einen deutlichen Abfall der Stoffwechselleistung im Verlauf der ersten 3 Wochen einer Zellkultur zeigten, gingen immer mit einem unerwünschten Ereignis, wie z.B. einer pH Schwankung durch stundenlangen Ausfall der Kohlendioxidgasbeimischung mit anschließender schneller Kompensation durch Natriumbicarbonat einher.

Die kontinuierlichen metabolischen Versuche mit Lidocain geben einen Überblick über den Verlauf während der gesamten Kulturdauer. Über drei Wochen sieht man eine deutliche Differenz zwischen der Konzentration des Fließgleichgewichts im Bioreaktor und der Konzentration im Medium. Der darauf folgende Abfall der Differenz liegt vor allem an weiteren Versuchen, wie Hypothermie oder Versuche für andere Oxygenierungs- und Konservierungsfragestellungen, die partiell schädigend auf die Zellkultur wirkten.

Die Kinetik von Lidocain im verwendeten Zellkultursystem wurde in mehreren Zellfreien Systemen gemessen. Die Kinetik wird von den einzelnen Kompartimenten des Bioreaktorkreislaufs bestimmt. Initial, beim Zeitpunkt null wird die Substanz in den auf Rezirkulation, d.h. keine Medium Zufuhr oder Ablauf, gebrachten äußeren Bioreaktorkreislauf eingebracht. Dort verteilt es sich sehr schnell. Parallel zu dieser Arbeit wurde eine Studie zur Verteilung mit Phenolrot durchgeführt, dabei wurde eine Aufsättigungskurve mit einem Grenzwert bei etwas über 10 min gemessen. Ein langsamerer Verteilungsvorgang, die Diffusion zwischen Bioreaktorkreislauf und dem Raum innerhalb der Membranen hin zum Zellkompartiment, findet verzögert statt. Bei einer noch unpublizierten Phenolrot Kinetikstudie zeigte sich eine Näherungs- Funktion vom Konzentrationsmaximum bis zum letzten Messwert. Die interpolierte Darstellung im Diagramm Lidocain Kinetik zeigt die gleiche Kinetik mit größerem Raster.

Nach den vorliegenden Ergebnissen kann man die Elimination von Lidocain als geeigneten Parameter für die metabolische Kompetenz des Cytochrom P-450 Systems der Zellkultur ansehen.

Der klinische Nutzen des Lidocain und MEGX Tests wird in der Literatur kritisch diskutiert. Ähnlich den Ergebnissen in der Zellkultur variieren auch in den quantitativen Leberfunktionstesten beim Patienten die Resultate. Darüber hinaus wird eine große Variabilität der Werte sogar in Patienten mit gleichartiger Ätiologie, Aktivität und Störung der Leberfunktion beobachtet¹¹⁸. Die Variabilität ist auch beim ABT groß, was auf bedeutsame interindividuelle Unterschiede in der Performance der microsomalen Enzyme hinweist. Im direkten Vergleich mit dem ABT und GEC konnte der Lidocain / MEGX Test Patienten mit leichter und schwerer Lebererkrankung schlechter differenzieren. Die beste Differenzierung gelang Meyer-Wyss et al mit dem Galaktose- Eliminations- Kapazitäts- Test. In der gleichen Studie wurde auch nur eine schwache Korrelation zwischen den Ergebnissen des GEC, ABT und dem Lidocain / MEGX Test gefunden. Große interindividuelle Schwankungen wurden auch von Bargetzi et al berichtet⁸⁰.

Lebererkrankungen per se sind mit einer reduzierten microsomalen Cytochrom P450 Enzym-Aktivität verbunden¹¹⁹ und die gestörte microsomale metabolische Aktivität steht primär in Beziehung zum Verlust von funktioneller Lebermasse¹²⁰.

Die Funktion der Zellen ist aber auch von den Kulturbedingungen abhängig. Zusammenhänge zwischen dem Erhalt typischer Leistung, der Induktion von Cytochrom P450 Isoenzymen in Hepatozytenkulturen und dem Sauerstoff- Partialdruck sowie Insulin und Glucagon Konzentration sind für Monolayerkulturen beschrieben¹²¹.

Der Metabolismus von Lidocain ist auch in älteren Lebern signifikant reduziert¹²².

4.1.2 MEGX

Die Interpretation der Ergebnisse für MEGX ist analog zu der von Lidocain, dessen Ausgangssubstanz. Die Variabilität ist bei MEGX am größten, von allen Parametern die gemessen wurden. Sowohl die Schwankungen intraindividuell, also auf eine Zellkultur bezogen, als auch die interindividuellen Unterschiede sind am größten. Bei der Bolus Versuchsreihe zeigt sich eine extrem große Variabilität für die Gruppe „Infektion“. Dies ist damit zu erklären, dass manche Bakterienstämme einen hohen synergistischen Stoffwechseleffekt haben, andere keinen. Deshalb ist ein hoher MEGX Wert, jenseits der in der Standardgruppe gemessenen Werte immer ein dringender Infektionsverdacht. Niedrige Werte jedoch bedeuten keinen Ausschluss, obwohl im Post Hoc Test der ANOVA die Gruppen „Standard“ und „Infektion“ eine signifikante Differenz aufweisen. Der Wertebereich der Standard-Gruppe überschneidet sich vollständig mit der Gruppe „Infektion“. Lediglich der Additionseffekt ist ein Zeichen.

Der T-Test zwischen den Gruppen „Standard“ und „Zellfreier Bioreaktor“ beweist einen signifikanten Unterschied. Die Werte für die zellfreien Bioreaktoren bewegen sich am Detektionslimit des verwendeten Analytik-Testkits, da ohne Zellen keine MEGX Synthese stattfindet.

Bei der Versuchsreihe mit kontinuierlicher Zufuhr von Lidocain kann der Verlauf der MEGX Synthese über 33 Tage hinweg dargestellt werden. Initial, an Tag 0, ist die MEGX Synthese am höchsten, danach hat sie ein weiteres Maximum im Bereich des 14. Tags und pendelt danach im Bereich von 25µg/ml ohne einen deutlichen Trend zu zeigen. Die Extremwerte und Ausreißer sind nicht alle nachvollziehbaren Ereignissen zuzuordnen. MEGX ist wegen seiner Schwankungen kein sensibler Parameter für Qualitätsänderungen im Verlauf, obwohl Werte jenseits des Bereichs der Standard Gruppe immer auf unerwünschte Veränderungen in der Zellkultur hindeuten. Die Festlegung eines Minimalwerts zur Qualitätssicherung ist empfehlenswert.

Die Kinetik von MEGX wurde ebenfalls in zellfreien Bioreaktoren gemessen. Der Verlauf ist der Kinetik von Lidocain ähnlich, da direkte Abhängigkeit besteht. Die Werte befinden sich am Detektionslimit des Abbott Testkits und kommen vermutlich durch spontanen Zerfall und Kreuzreagibilität des Testkits mit Lidocain Zustände und sind deshalb nur bedingt aussagekräftig. Im zellgefüllten Bioreaktor ist die Kinetik durch den Metabolismus von Lidocain charakterisiert und korreliert individuell abhängig von der Zellkultur mit diesem.

In der Tierexperimentellen Erprobung eines Leberunterstützungssystems wurde MEGX und Lidocain bereits verwendet um den Unterschied zwischen zwei Kontrollgruppen (eine Gruppe

zellfreies Leberunterstützungssystem- andere Gruppe kein extrakorporales System) und Bioraktor mit Zellen zu demonstrieren¹²³.

Im klinischen Gebrauch ist der MEGX Test umstritten. Manche Autoren geben ihm einen Stellenwert für bestimmte Fragestellungen, wie Lamesch et al, die den MEGX Test für einen nützlichen Parameter halten Patienten nach LTx in gute und schlechte Prognosen zu unterteilen¹²⁴. Schroeder et al¹²⁵ halten den Lidocain / MEGX Test für nützlich um Spender Organe zu evaluieren und so das Optimum an verfügbaren Organen zu erreichen. Burdelski et al fand heraus, dass das Risiko der initialen Nicht- Funktion von transplantierten Lebern auf 1 zu 3 reduziert werden kann¹²⁶, in einer späteren Studie wurde die Korrelation zum Sauerstoffverbrauch nach der Revaskularisierung mit der MEGX Synthese dargestellt¹²⁷. Für ein 20 Tage Leber- Transplantat Überleben fanden Oellerich et al. eine prognostische Sensivität von 73% und eine Spezifität von 78% des Megx Tests^{128 129}. Ercolani et al gruppiert Patienten nach MEGX Schwellenwerten von 25 ng/ml und 10 ng/ml Serum- MEGX- Konzentration und berichtet von Signifikanten Aussagen zur Prognose der Patienten, allerdings in Kombination mit dem Child- Pugh- Score¹³⁰. Shiffman et al beschreibt die Korrelation von MEGX Synthese und Leberhistologie sowie der Child Klassifikation mit Signifikanten Ergebnissen¹³¹. Fabri et al kommentiert die Ergebnisse von Shiffman et al kritisch: Der Metabolismus ist abhängig von der Leberhistologie aber eine Sensitivität von 65% um Patienten mit Child Klasse A Leberzirrhose zu detektieren, wie von Shiffman berichtet, ist nur ein wenig akkurater als das einfache Werfen einer Münze; die quantitative Messung der Funktion der Leber ist schwierig und mit Fehlern behaftet wegen der interindividuellen Variabilität des Metabolismus von Substraten¹³². Huang et al. hat mit einem kleinem Patientenkollektiv und anderen Granzwerten für Sensitivität, Spezifität und Akkurateesse Werte von über 80%¹³³. Weitere Literatur zu MEGX wurde ansonsten bereits im Abschnitt zur Testsubstanz Lidocain diskutiert.

4.1.3 Sorbitol

Mit Sorbitol kann eine Aussage über die Funktion des Insulinunabhängigen Zuckerstoffwechsels gemacht werden.

Die Unterschiede der Mittelwerte in der ANOVA mit Post Hoc Test sind für die Gruppen „Standard“ verglichen mit „Infektion“ und „Zellfreier Bioreaktor“ signifikant. Um einen Bereich festzulegen, in dem eine normale Funktion der Zellen angenommen werden kann eignet sich die Abgrenzung zwischen Standard Gruppe und „Zellfreier Bioreaktor“. Die obere Quartile der Standard Gruppe könnte dazu die Obergrenze sein, der Minimalwert der Standard Gruppe für Δ -Sorbitol die untere Begrenzung. Ein infizierter Bioreaktor zeigt mehrere extrem niedrige Δ -Sorbitol Werte, was auf einen Summationseffekt durch den Bakterienstoffwechsel hindeutet. Sorbitol hat einen gleichmäßigen intraindividuellen Verlauf und nur mäßige interindividuelle Schwankungen.

Die Fragestellung des Zurückweisens der Nullhypothese „der Bioreaktor ermöglicht keine Lebertypische Leistung“ mittels T-Test zwischen der Standard und „Zellfreier“ Bioreaktor“ Gruppe ist hochsignifikant. Damit leistet auch Sorbitol einen Beitrag zum Wirksamkeitsnachweis des Bioreaktors.

Bei den kontinuierlichen metabolischen Untersuchungen mit Sorbitol durch Zugabe im Medium und einmal täglicher Messung des Fliesgleichgewichts zeigt sich ein guter Verlauf über die Zeitdauer des Routine Stand-By Protokolls. In den ersten beiden Tagen ist der Mittelwert von Δ -Sorbitol etwas geringer als in den darauf folgenden 14 Tagen. Die Werte sind insgesamt stabil auf hohem Niveau, Ausreißern und Extremwerten kann immer ein unerwünschtes Ereignis, wie unsachgemäße Gaseinstellung nach Wechsel einer Gasflasche zugewiesen werden. In den letzten Kategorien der Kulturtage schwanken die Werte da in diesem Zeitrahmen das Standard Protokoll bei vielen Zellkulturen verlassen wurde und Oxygenierungs- und Konservierungsstudien durchgeführt wurden.

Die Kinetik von Sorbitol gemessen in zellfreien Bioreaktor- Systemen ist geprägt durch schnelle Aufsättigung in den ersten 30 Minuten und ein darauf folgendes geringfügig niedrigeres Plateau. Die Verteilung zwischen den verschiedenen Kompartimenten des Bioreaktor- Systems ist als schnell einzustufen.

Insgesamt ist Sorbitol ein sensibler Parameter für den Energieverbrauch und ist für die Routine der Qualitätssicherung ein wertvoller Beitrag.

Im klinischen Gebrauch ist Sorbitol erste Wahl als Testsubstanz um den hepatischen Blutfluss mit

einer nicht-invasiven Technik zu Messen¹³⁴. Des Weiteren repräsentiert die nicht-renale Clearance von Sorbitol den funktionellen Fluss in Patienten mit Zirrhose. Bei der Verwendung der Infusions- und Messtechnik von Bradley^{135 136} kann die Differenz zwischen totalem und funktionellem Blutfluss als intrahepatischer Shuntfluss betrachtet werden.

4.1.4 Galaktose

Der Stoffwechsel von Galaktose ist eine Lebertypische Leistung aus dem Bereich des Energiestoffwechsels.

Galaktose, bzw. die Differenz des Messwerts zum Mediumleerwert, Δ -Galaktose zeigt bei den Post Hoc Tests der ANOVA zwischen allen Gruppen hochsignifikante Unterschiede. Dies liegt vor allem an der gleichmäßigen Homogenität der Varianz. Galaktose ist als Parameter zur Qualitätssicherung geeignet, der Bereich der tolerierten Werte für ein Zellsystem, dass klinisch Verwendung finden soll, könnte bei der oberen Quartile beginnen und bis zum Minimalwert der Standardgruppe gehen.

Der Beitrag zum Zurückweisen der Nullhypothese und damit zum Wirksamkeitsnachweis durch den T-Test zwischen den Gruppen Standard und „Zellfreier Bioreaktor“ ist hochsignifikant. Die Nullhypothese „der Bioreaktor ermöglicht keine Lebertypische Leistung“ kann mit Galaktose ebenfalls zurückgewiesen werden.

Im zellfreien System ähnelt die Kinetik von Galaktose der des anderen Zuckers Sorbitol. Nach 30 Minuten ist eine Aufsättigung da mit einem Plateau über den gesamten Messzeitraum von 180 Minuten. Eine schnelle Verteilung über alle Kompartimente des Bioreaktor-Systems ist anzunehmen.

Bei den kontinuierlichen metabolischen Leberfunktionstests mit Berechnung der Differenz zwischen Fließgleichgewicht und Mediumleerwert ist Galaktose ebenfalls Sorbitol von der Dynamik ähnlich. In den ersten Tagen sind die Mittelwerte geringfügig unter den Werten der darauf folgenden 2 Wochen, die Werte steigen in der ersten Woche treppenförmig an, wahrscheinlich ist dieses Phänomen mit Enzyminduktion zu erklären^{137 138}. Während der Routinemäßigen Kulturphase unter dem Stand-By Protokoll bewegen sich die Mittelwerte insgesamt auf hohem und gleichmäßigen Level. Allen Ausreißern und Extremwerten in diesem Bereich lassen sich unerwünschte Ereignisse zuordnen. Ab Kategorie des Kulturtags „day 17-21“, wurde das Stand-By Protokoll zugunsten von Oxygenierungs- und Konservierungsuntersuchungen verlassen, die Streubreite der Werte in diesem Bereich ist deshalb groß und ohne weitere Groupierung wenig gehaltvoll.

Interferenzen mit anderen Substanzen sind bei Galaktose möglich. Eine Studie von Keiding et al zeigte, dass Ethanol die Kinetik der Galaktose Elimination stark beeinträchtigt, K_m wurde signifikant von 0,23 mmol/l auf 0,03 mmol/l reduziert¹³⁹. Dies spricht auf jeden Fall für die gleichzeitige Verwendung von Galaktose und Ethanol als Testsubstanzen.

Durch die gute Reproduzierbarkeit und Stabilität ist Δ -Galaktose als guter Parameter für die Qualitätssicherung zu gebrauchen.

Im der klinischen Anwendung ist die die Galaktose- Eliminations- Kapazität bei der Verlaufsbeurteilung eines etablierten Leberschadens nützlich¹⁴⁰. Der Zeitpunkt des Eintritts der Leberinsuffizienz kann bei chronisch progressiven Leber- Erkrankungen mit großer Genauigkeit voraus gesagt werden¹⁴¹.

Fabbri et al¹⁴² wertete die Ergebnisse von 868 GEK Tests in Patienten mit Lebererkrankungen aus, die Ergebnisse zeigen eine intrinsische Variabilität des Tests von 10%, ausserdem gibt Fabbri den Hinweis die Datenevaluation sorgfältig durchzuführen bei größeren intraindividuellen Schwankungen, die Schlussfolgerung bewertet den Test aber durchaus positiv für die Evaluation von Lebererkrankungen. Des Weiteren ist der Single Sample Galaktose Test der Messung an mehreren Zeitpunkten in der Genauigkeit unterlegen, insbesondere bei Patienten mit fortgeschrittener Lebererkrankung¹⁴³.

4.1.5 Ammoniak

Der Abbau von Ammoniak erfolgt als Lebertypische Leistung vor allem durch den Harnstoffzyklus.

Die Differenz zwischen der Konzentration von Ammoniak an den Test- Zeitpunkten 0 min und 90 min, Δ -Ammoniak zeigt in der ANOVA einen hochsignifikanten Unterschied zwischen allen Gruppen. Der Post Hoc Test zeigt einen Unterschied zwischen der Gruppe Zellfreier Bioreaktor, Standard, Therapie und Infektion.

Der T-Test ergibt ebenfalls einen hochsignifikanten Unterschied zwischen der Gruppe „Standard“ und „Zellfreier Bioreaktor“. Ammoniak ist somit ebenfalls ein Parameter, der zum Leistungsnachweis der Leberzellkultur geeignet ist.

Die Kinetik von Ammoniak bei den Bolus Studien ist von einer schnellen Aufsättigung mit Maximum nach 30 min und einem langsamen Abfall geprägt.

Bei den kontinuierlichen Leberfunktionstesten wurde auf eine Zugabe von Ammoniak in höheren Dosen im Medium verzichtet um eine zu hohe Dauerbelastung der Zellen mit exogenem Ammoniak zu vermeiden. Stattdessen wurde eine umfangreiche Analytik des Amino- und Ketonsäurenstoffwechsels mittels HPLC durchgeführt, die in einer eigenständigen, noch unpublizierten Arbeit beschrieben werden.

4.2 Syntheseparameter

4.2.1 Albumin

Albumin ist ein Leberspezifischer Parameter, der gerne zur Beurteilung von Zellkulturen herangezogen wird.

Der Verlauf der Albumin Freisetzung gleicht mit seinem Peak initial dem der Enzymliberation. Zu Beginn der Zellkultur kann man von einer hohen Freisetzung durch geschädigte Zellen ausgehen. Im weiteren Verlauf gibt es noch mal ein weiteres Hoch in der zweiten Woche der Zellkultur. Dies wurde in anderen Bioreaktorkonstruktionen ebenfalls beschrieben¹⁴⁴.

Albumin ist als Parameter, der die Proteinbiosynthese von Hepatozyten repräsentiert, zur Qualitätssicherung interessant. Außerdem zur Beurteilung der Differenzierung der Leber-Zellkultur.

4.2.2 Ammoniak Basal und Harnstoff

Ammoniak, als Abbauprodukt des Aminosäurestoffwechsels und der weniger toxische Metabolit Harnstoff repräsentieren ebenfalls Lebertypische Leistungen.

Im Verlauf über die Kategorie der Kulturtage ist Ammoniak initial höher, dann stabil und steigt gegen Ende der zweiten Woche treppenförmig an. Harnstoff verhält sich spiegelbildlich dazu. Der Metabolismus der Umwandlung von Ammoniak zu Harnstoff verschiebt sich zugunsten einer Freisetzung von Ammoniak. Eine Antwort auf die Frage ob es sich um eine Anpassung der Zellkultur an die Bedingungen im Bioreaktor handelt oder um einen Verlust differenzierter Zellfunktionen könnte eine Genexpressions- Studie mit variierendem Ammoniak- Spiegel bringen. Für die Bewertung der Zellkultur im Routinebetrieb eignet sich die Bestimmung der Konzentration von Ammoniak und Harnstoff wegen ihrer guten Reproduzierbarkeit und der einfachen Analytik.

Hohe Ammoniak Werte über 500 µmol/l sind immer ein ernstzunehmender Hinweis auf eine Infektion. Eine große Diskrepanz zwischen dem Ammoniak- und dem Harnstoffwert innerhalb eines Messwertes ist ebenfalls ein Anhaltspunkt für eine Infektion.

Die physiologische Ammoniak Elimination und Urea Synthese ohne weiteren Zusatz von Ammoniak im Medium bleibt über den gesamten Kulturzeitraum von bis zu 33 Tagen weitgehend stabil. Dies deckt sich mit Ergebnissen die mit anderen Bioreaktoren von unabhängigen Arbeitsgruppen¹⁴⁴ erzielt wurden. Im klinischen Einsatz zeigte das Leberunterstützungssystem, das dieser Arbeit zugrunde liegt, dass es in der Lage ist den Anstieg der Plasma- Ammoniak- Konzentration abzuschwächen und Urea zu synthetisieren bzw. freizusetzen¹⁴⁵.

4.2.3 Lactat

Der Verlauf von Lactat ist durch einen höheren Mittelwert an Tag 1, einer stabilen Phase und einem Ansteigen der Mittelwerte in der zweiten Woche charakterisiert.

Zur Erkennung von Infektionen ist Lactat nur bedingt in der Lage, bei ca. 50% höheren Werten innerhalb einer Zellkultur und eines Tages sollte man unbedingt nach einem unerwünschten Ereignis suchen.

Lactat, als anaerobes Stoffwechselprodukt der Glykolyse, ist ein Parameter, der „Stress“ in der Zellkultur reflektiert wenn er die normalen Werte übersteigt. In der Qualitätssicherung ist Lactat eine wertvolle Information, die auf Probleme in der Gas- bzw. Sauerstoffversorgung hinweist.

Die Aufnahme von Lactat in die Hepatozyten ist von der Konzentration der Glukose¹⁴⁶ im Medium und vom pH¹⁴⁷ abhängig. Der im Medium enthaltene Glucosewert von gemessenen 12 mmol/l ist aber nur an der unteren Schwelle zur Inhibition der Aufnahme von Lactat in die Zellen.

4.3 Gesamtbewertung der Zellkulturen

Ähnlich den Ergebnissen in der Zellkultur variieren auch in den quantitativen Leberfunktionstesten beim Patienten die Resultate. Darüber hinaus wird eine große Variabilität der Werte sogar in Patienten mit gleichartiger Ätiologie, Aktivität und Störung der Leberfunktion beobachtet¹¹⁸; eine

Korrelation zwischen GEC, ABT oder MEGX mit den konventionellen Methoden zur Bewertung der Leberfunktion wie Prothrombin Zeit, Serum Bilirubin oder Albumin Synthese wurde in dieser Studie von von Meyer-Wyss et al nicht gefunden. In der dynamischen Zellkultur haben die individuellen Parameter und Tests ebenfalls nur eine geringe Korrelation, sie stehen jeweils für eine eigenständige Funktion in den kultivierten Zellen und ergeben nur in ihrer Gesamtheit eine umfassendere Aussage über den Status der Zellkultur. Die Variabilität ist durch die individuelle Genetik der als Zellquelle dienenden Schweine bedingt. Galaktose und Sorbitol haben eine geringere Schwankungsbreite als Lidocain und MEGX. Lidocain ist von der Variabilität ebenfalls geringer als MEGX, für den klinischen Einsatz empfiehlt eine Autorengruppe deshalb die Verwendung der Lidocain Elimination der MEGX Synthese vorzuziehen ¹⁴⁸. In der Zellkultur verhält sich die Schwankungsbreite ähnlich, es macht Sinn, dieser Empfehlung zu folgen und nur Lidocain als Parameter zur Bewertung des Cytochrom P450 Metabolismus heranzuziehen. Außerdem gilt es zu berücksichtigen, dass Lidocain nur die Funktion eines Teils der Cytochrom P450 Familie reflektiert, wegen der interindividuellen Unterschiede ist es als alleiniger Marker der Zellfunktion deshalb nicht geeignet ¹⁴⁹.

Die Abhängigkeit der gemessenen Substanzen von der Kinetik ist eine Limitation um den Bioreaktor mit anderen System oder der in vivo Situation beim Menschen zu vergleichen. Wie in der Einleitung bereits erwähnt gehören alle gewählten Substanzen zum Fluss Limitierten Schema der hepatischen Clearance, ein Parameter aus der Enzym Limitierten Gruppe wie Antipyrin wäre für die Zukunft zu empfehlen um eine objektivere Clearance ohne Einfluss der Kinetik berechnen zu können ¹⁵⁰.

Die Oxygenierung der Zellkulturen ist ein Faktor, der im Routine Betreuungs- Protokoll lediglich durch regelmäßige Blutgasanalysen aus dem Bioreaktorkreislauf gemessen wird. Die metabolische Kapazität der Leberzellen korreliert in der perfundierten Leber für die Elimination von Galaktose und Lactat mit der Zufuhr von Sauerstoff ¹⁵¹. Lactat kann indirekt ein Feedback für die Oxygenierung der Zellkultur geben. Der pH Wert im physiologischen Bereich ist ebenfalls eine wichtige grundsätzliche Voraussetzung für die einwandfreie Funktion der Zellkultur.

Da die meisten Parameter nur gering korrelieren und jeder einzelne eine Aussage über eine bestimmte Funktion bzw. Zelltypische Leistung mit sich bringt ist es sinnvoll- ähnlich dem vorgehen in der klinischen Diagnostik- mehrere repräsentative Parameter für verschiedene Funktionen zu haben um eine möglichst umfangreiches Bild der Zellkultur zu bekommen. Bei den metabolischen Leberfunktionstesten bietet sich die Verwendung von Galaktose und Lidocain an, bei den Enzymen ALT, AST und LDH ¹⁵². Als Synthese Parameter sind Albumin für die Proteinbiosynthese und Harnstoff und Ammoniak für die Detoxifikation und den Stoffwechsel der Aminosäuren geeignet.

Die Enzyme, vor allem AST, ALT und LDH (Ergebnisse hier nicht dargestellt) eignen sich als Parameter um einen Zellschaden in der Kultur zu detektieren und sind somit ein wertvoller Beitrag zur Qualitätssicherung. Enzymliberation ist aber nicht geeignet um eine Aussage über den Funktionellen Zustand der Zellkultur zu machen.

Der Metabolismus von Aminosäuren eignet sich wegen der aufwendigen Analytik und Interpretation nicht als Routineparameter zur Qualitätssicherung, sie sind interessant für Studien über die Leistung der Zellkultur.

Der Verlauf der Zellkultur kann in 3 Phasen eingeteilt werden: (1) Erholung und Reorganisation nach der Zellisolierung in den ersten 3 Tagen; (2) Stabile Kulturbedingungen bis Tag 14; (3) moderater Abfall der Funktion ab Tag 14. Dies deckt sich mit allen gemessenen Parametern, den Enzymen, der Synthese Parametern und den metabolischen Parametern ¹¹⁷.

Als Untersuchungsschema haben die in der Tabelle 15 aufgeführten Tests sich durch reproduzierbare Ergebnisse und sich ergänzende Informationen über den Status der Leber- Zellkultur zur täglichen Beurteilung der Qualität der Zellkultur bewährt. Sie decken eine akzeptabel repräsentatives Spektrum der Leistung und Status der Zellkultur ab.

Tabelle 15: Übersicht Qualitätssicherung Zellkultur (In- Prozess Kontrollen)

Art	Funktion in der Qualitätssicherung
-----	------------------------------------

Enzym Liberation	Integrität der Plasmamembran bzw. Zellschaden, Abschätzung der Schädigung mittels Enzymmuster
Lidocain / MEGX	Cytochrom P450 Metabolismus
Galaktose	Galaktokinase, Kohlenhydratmetabolismus, Energiestoffwechsel
Sorbitol	Sorbitoldehydrogenase, Kohlenhydratmetabolismus, Fructose Stoffwechselweg
Ammoniak	NH ₄ Detoxifikation, Harnstoffzyklus, indirekt Aminosäurenmetabolismus
Harnstoff	NH ₄ Detoxifikation, Harnstoffzyklus, indirekt Aminosäurenmetabolismus
Lactat	Glykolyse, Oxygenierung bzw. „Stress“ in der Zellkultur
Pig- Albumin	Protein Biosynthese, Differenzierung d. Hepatozyten
Oxygenierung, Gasanalyse	Normbereich von pH als Voraussetzung
Sterilkontrolle	Keimfreiheit

Hinsichtlich der therapeutisch Nutzbarkeit der Zellkultur ist es nicht zwingend nötig einen festen Zeitrahmen zu bestimmen, besser eignet sich die Definition von Normbereichen der in der Übersichts- Tabelle angegebener Parameter. Die Ressourcen sind damit effektiver zu Nutzen und dennoch sicher in der Handhabung.

Für die Definition der Zellkultur als aktives Biologic im Rahmen einer Zulassung bei den dafür zuständigen Autoritäten wie die EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) und die FDA (U. S. Food and Drug Administration) eignet sich Harnstoff als Leitparameter, da es ein sensibler Parameter für den Zustand der Leber- Zellkultur ist. Wahrscheinlich auch die wichtigste typische Leistung von Hepatozyten im als Therapie Indikation vorgesehen Krankheitsbild des akuten Leberversagens. Eine Kombination aus verschiedenen Parametern ist wahrscheinlich die bessere Lösung für die Standardisierung des Systems für klinische Studien.

4.4 Ausblick

Vielfältige Verbesserungen des Managements von dynamischen Bioreaktor- Zellkulturen sind von Interesse. Eine vorgeschlagene Verbesserung zur weiteren Fehlerbereinigung und Standardisierung der Messwerte ist die Einführung etablierter biotechnologischer Bilanzierungsschemata für die Testsubstanzen. Dazu gehört die genaue Protokollierung des Medium- Volumens, das zugeführt wird bzw. abläuft.

Für Untersuchungen zur Funktion von Leberzellen sind weitere interessante Parameter und Enzymfunktionen die Monooxygenasen mit der Testsubstanz Diazepam. Analytik inklusive der bekannten wichtigsten Metaboliten erfolgt am besten durch HPLC. Die klinische Bedeutung der Benzodiazepine beim hepatischen Koma und die repräsentative Lebertypische Detoxifikation machen laut Bader et al.¹⁵³ Diazepam zu einem wertvollen Test zur Beurteilung der Funktion einer Zellkultur für den klinischen Einsatz.

Für die initiale Messung der Zellviabilität vor dem Einfüllen der Zellsuspension in einen Bioreaktor bietet sich als anspruchsvollere Methode die Flusszytometrie an¹⁵⁴. Dabei hat die Zellsuspension als eine Einzelzell- Suspension vorzuliegen, was eine weitere Aufbereitung der Probe für die Flow Cytometrie und dadurch eine gering gradige Verfälschung des Ergebnisses mit sich bringt. Ein

Vorteil gegenüber der einfachen Trypan- Blau Mikroskopie ist die bessere Reproduzierbarkeit, da die Flusszytometrie nicht von subjektiver Bewertung und Auszählung unter dem Mikroskop abhängig ist. Ein wichtigerer Vorteil ist die Möglichkeit, die einzelnen Zellreihen der Co- Kultur aufgeschlüsselt zählen zu können.

Die Gewinnung von mRNA und DNA aus den Bioreaktoren und die damit verbundenen Analytischen Methoden der Molekularbiologie, insbesondere der Genexpression, aber auch die einfache Bestimmung des DNA Bestandteils der Zellen stellen ein Potential dar, das erschlossen werden sollte. Eine Methode der Zellbiopsie aus den Bioreaktoren mittels Kollagenase für Flachmembranbioreaktoren ist in der Literatur von De Bartolo et al¹⁵⁵ beschrieben. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass nur eine Endpunktbestimmung möglich ist zu einem Zeitpunkt zu dem der Bioreaktor klinisch nicht mehr einsetzbar ist. Eine Möglichkeit, dies zu umgehen ist die Nutzung von Bioreaktoren in Lab- Scale, die nur für wissenschaftliche Fragestellungen eingesetzt werden.

Die Gen Expression kann Information über den Grad der Differenzierung geben, sowie eine gute Rückkopplung um Variationen in den Kulturbedingungen zu messen oder Unterschiede in Zelllinien so weit wie möglich zu diskriminieren¹⁵⁶. Außerdem wird die Gen Expression von Wissenschaftlern des King College in London als Standard für die Bewertung der Zellfunktion in Bioartifizierten Leberunterstützungssystemen propagiert¹⁵⁷. Um einen umfassenden Überblick über das genetische Programm der Zelle zu bekommen bieten Microarrays inzwischen eine Methode, die für viele Fragestellungen reizvoll ist¹⁵⁸.

Eine weitere Möglichkeit pharmakokinetische Prozesse zu studieren bietet der Einsatz von Stablen Isotopen¹⁵⁹. Vorgänge wie Absorption, Distribution, Biotransformation und Exkretion sowie Pharmaka- Interaktionen können untersucht werden.

Durch Kryokonservierung und Pharmakologische Modulation bestehen Aussichten die Bereitstellung von Zellbasierten Therapiesystemen auf Abruf zu vereinfachen. Ermutigende Ergebnisse in diesem Bereich wurden von Makowka et al¹⁶⁰ und Maganto et al erzielt^{161 162 163}.

Die vorliegende Arbeit untersucht Leberfunktionstests an porcinen Zellen. Die Zellquelle des Leberunterstützungssystems wurde inzwischen im Rahmen kontinuierlicher Verbesserung der Bio-Kompatibilität auf humane Leberzellen umgestellt. Die Leberzellen stammen aus für Transplantation abgelehnten Organen und werden durch eine leicht modifizierte 5- Schritt Kollagenase- Perfusion gewonnen. Die ersten mikroskopischen Ergebnisse zeigen, dass die Zellen gut in Bioreaktoren kultiviert werden können¹⁶⁴. Erste ermutigende klinische Ergebnisse liegen vor⁶⁹.

Für die Zukunft stehen weitere Zellquellen, darunter die Immunologische beste- autologe Zellen in Aussicht. Der interessanteste Aspekt in dieser Richtung ist sicherlich das zunehmende Wissen über die Differenzierung von Stammzellen und die Regeneration von Organen. Das Potential der adulten Stammzellen ist sehr viel versprechend. Die Mechanismen in vitro zu steuern ist allerdings nur rudimentär möglich. Eine gute Übersicht bietet ein Review von Gerlach und Zeilinger¹⁶⁵. Eine weitere Alternative könnten genetisch modifizierte xenogene Zellen sein, wie porcine Zellen mit humanen Blutgruppenantigenen sowie Komplement- Aktivierungs- Inhibitoren auf den Zellmembranen. Diese transgene Schweine wurden im Rahmen der Erforschung der Xenotransplantation entwickelt¹⁶⁶.

Die möglichen Verbesserungen des bestehenden Leberunterstützungssystems liegen nicht nur auf der Seite der Zellen und der Biologie, auch das Zellkultursystem mit dem Bioreaktor als Hauptkomponente ist ein Ansatzpunkt, im Bereich des Engineering. Ebenso der Bioreaktormonitor als Steuereinheit der Zellkultur: Feedback-Regulation durch Erfassung physikalischer und chemischer Parameter wie Druck und pH- Wert mittels Sensoren, gekoppelt mit Mikrocontroller gesteuerten Pumpen und Gaszufuhr bzw. -mischung kann potentiell die Anzahl der wegen ungestimmtes Handling der Zellkultur bedingten Ausreißer und Extremwerte sowie mittels geringere Schwankungsbreite in den Kulturbedingungen auch geringe Variabilität bei den Ergebnissen bewirken.

In den letzten Jahren entstand aus verschiedenen wissenschaftlichen Bereichen wie Tissue Engineering und Entwicklungs- Biologie die neue Disziplin Regenerative Medizin, die sich eingehend mit der Erforschung von Gewebe- und Organfunktionen beschäftigt, fokussiert auf das Ziel Therapieformen zu finden. Die vorliegende Arbeit beabsichtigt einen bescheidenen Wissenszuwachs im Bereich dynamischer Zellkulturen beizusteuern.

5 Zusammenfassung

Die Arbeit befasst sich mit Methoden der Erfassung metabolischer Funktion einer dynamischen Zellkultur in Bioreaktoren zur klinischen Verwendung als Leberunterstützungssystem. Der Fokus liegt auf der Etablierung von Tests zur Qualitätssicherung als effiziente In- Prozess Kontrollen während der Bereitstellungsphase der Zellkulturen. Weitere Ziele sind ein Beitrag zu Wirksamkeitsnachweis und zur Charakterisierung des Systems im Rahmen von Zulassungen als „Biologic“.

Bei der experimentellen Untersuchung unter Verwendung von Leberzellkulturen aus porcinen Organen wurden der Lidocain- MEGX Test, die Elimination von Galaktose und Sorbitol sowie die Elimination von Ammoniak und die Synthese von Harnstoff, Lactat und Albumin berücksichtigt. Dies erfolgte mittels Bolus- und Fließgleichgewichtsuntersuchungen sowie Konzentrationsbestimmungen.

Die Ergebnisse zeigten für alle Parameter einen hochsignifikanten Unterschied zu Zellfreien Bioreaktoren, sowie einen typischen Verlauf, der in eine initiale Adhäsionsphase, eine stabile Kulturphase und eine darauf folgende erweiterte Phase mit langsamer Abschwächung der Zelleistungen gegliedert werden kann.

Die Parameter erwiesen sich prinzipiell alle geeignet für den Einsatz in der Qualitätssicherung der dynamischen Zellkultur. Ein kombiniertes Untersuchungsschema bestehend aus Parametern die die Integrität der Zellmembranen reflektieren, wie die Freisetzung von Enzymen, sowie metabolischen Parametern wie Lidocain, Galaktose, Sorbitol als auch Syntheseparameter, für Proteine Albumin, als Hepatozyten typische Leistungen die Synthese von Harnstoff und der Abbau von Lactat ist in der Lage einen ausreichend umfassenden Einblick in den Status der dynamischen Zellkultur zu liefern.

Literaturverzeichnis

- ¹ Bissell, D. M., and Guzelian, P. S. 1980. Phenotypic stability of adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Annals of the New York Academy of Sciences* 349: 85-98.
- ² Ichihara, A., Nakamura, T., Tanaka, K., Tomita, Y., Aoyama, K., Kato, S., and Shinno, H. 1980. Biochemical functions of adult rat hepatocytes in primary culture. *Annals of the New York Academy of Sciences* 349: 77-84.
- ³ Crane, L. J., and Miller, D. L. 1983. Plasma protein induction by isolated hepatocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 53-54: 89-109.
- ⁴ Flaim, K. E., Hutson, S. M., Lloyd, C. E., Taylor, J. M., Shiman, R., and Jefferson, L. S. 1985. Direct effect of insulin on albumin gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. *American Journal of Physiology* 249: E447-53.
- ⁵ Lloyd, C. E., Kalinyak, J. E., Hutson, S. M., and Jefferson, L. S. 1987. Stimulation of albumin gene transcription by insulin in primary cultures of rat hepatocytes. *American Journal of Physiology* 252: C205-14.
- ⁶ Michalopoulos, G., Sattler, G. L., and Pitot, H. C. 1976. Maintenance of microsomal cytochromes b5 and P-450 in primary cultures of parenchymal liver cells on collagen membranes. *Life Sciences* 18: 1139-44.
- ⁷ Jefferson, D. M., Reid, L. M., Giambrone, M. A., Shafritz, D. A., and Zern, M. A. 1985. Effects of dexamethasone on albumin and collagen gene expression in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Hepatology* 5: 14-20.
- ⁸ Nawa, K., Nakamura, T., Kumatori, A., Noda, C., and Ichihara, A. 1986. Glucocorticoid-dependent expression of the albumin gene in adult rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* 261: 16883-8.
- ⁹ Michalopoulos, G., and Pitot, H. C. 1975. Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations. *Experimental Cell Research* 94: 70-8.
- ¹⁰ Michalopoulos, G., Sattler, C. A., Sattler, G. L., and Pitot, H. C. 1976. Cytochrome P-450 induction by phenobarbital and 3-methylcholanthrene in primary cultures of hepatocytes. *Science* 193: 907-9.
- ¹¹ Rojkind, M., Gatmaitan, Z., Mackensen, S., Giambrone, M. A., Ponce, P., and Reid, L. M. 1980. Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. *Journal of Cell Biology* 87: 255-63.
- ¹² Spray, D. C., Fujita, M., Saez, J. C., Choi, H., Watanabe, T., Hertzberg, E., Rosenberg, L. C., and Reid, L. M. 1987. Proteoglycans and glycosaminoglycans induce gap junction synthesis and function in primary liver cultures. *Journal of Cell Biology* 105: 541-51.
- ¹³ Guguen-Guillouzo, C., Clement, B., Baffet, G., Beaumont, C., Morel-Chany, E., Glaise, D., and Guillouzo, A. 1983. Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Experimental Cell Research* 143: 47-54.
- ¹⁴ Begue, J. M., Guguen-Guillouzo, C., Padeloup, N., and Guillouzo, A. 1984. Prolonged maintenance of active cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes co-cultured with another liver cell type. *Hepatology* 4: 839-42.
- ¹⁵ Guguen-Guillouzo, C., Clement, B., Lescoat, G., Glaise, D., and Guillouzo, A. 1984. Modulation of human fetal hepatocyte survival and differentiation by interactions with a rat liver epithelial cell line. *Developmental Biology* 105: 211-20.
- ¹⁶ Clement, B., Guguen-Guillouzo, C., Campion, J. P., Glaise, D., Bourel, M., and Guillouzo, A. 1984. Long-term co-cultures of adult human hepatocytes with rat liver epithelial cells: modulation of albumin secretion and accumulation of extracellular material. *Hepatology* 4: 373-80.

- ¹⁷ Goulet, F., Normand, C., and Morin, O. 1988. Cellular interactions promote tissue-specific function, biomatrix deposition and junctional communication of primary cultured hepatocytes. *Hepatology* 8: 1010-8.
- ¹⁸ Fujita, M., Spray, D. C., Choi, H., Saez, J. C., Watanabe, T., Rosenberg, L. C., Hertzberg, E. L., and Reid, L. M. 1987. Glycosaminoglycans and proteoglycans induce gap junction expression and restore transcription of tissue-specific mRNAs in primary liver cultures. *Hepatology* 7: 1S-9S.
- ¹⁹ Tseng, S. C., Lee, P. C., Ells, P. F., Bissell, D. M., Smuckler, E. A., and Stern, R. 1982. Collagen production by rat hepatocytes and sinusoidal cells in primary monolayer culture. *Hepatology* 2: 13-8.
- ²⁰ Gerlach, J. C., Ziemer, R. A., Spatkowski, G., Zeilinger, K., and Neuhaus, P. 1997. Visualization of liver sinusoidal endothelial cell repair behavior after preservation by in vitro time-lapse video microscopy. *Transplantation* 63: 455-9.
- ²¹ Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. 1983. Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 53-54: 35-56.
- ²² Ben-Ze'ev, A., Robinson, G. S., Bucher, N. L., and Farmer, S. R. 1988. Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 2161-5.
- ²³ Guguen-Guillouzo, C. 1986. Role of homotopic and heterotopic cell interactions in expression of specific functions by cultured hepatocytes. Pages 259-284 in A. Guillouzo, editors. *Isolated and cultured hepatocytes*. Jhn Libbey & Co. Ltd, London, England.
- ²⁴ Guillouzo, A. 1992. Hepatotoxicity. Pages 45-81 in J. Frazier, editors. *In vitro toxicity testing. Applications to safety evaluation*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong-Kong.
- ²⁵ Bissell, D. M., Arenson, D. M., Maher, J. J., and Roll, F. J. 1987. Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *Journal of Clinical Investigation* 79: 801-12.
- ²⁶ Dunn, J. C., Yarmush, M. L., Koebe, H. G., and Tompkins, R. G. 1989. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB Journal* 3: 174-7.
- ²⁷ Dunn, J. C., Tompkins, R. G., and Yarmush, M. L. 1991. Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnology Progress* 7: 237-45.
- ²⁸ Dunn, J. C., Tompkins, R. G., and Yarmush, M. L. 1992. Hepatocytes in collagen sandwich: evidence for transcriptional and translational regulation. *Journal of Cell Biology* 116: 1043-53.
- ²⁹ Isom, H. C., Secott, T., Georgoff, I., Woodworth, C., and Mummaw, J. 1985. Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 3252-6.
- ³⁰ Isom, I., Georgoff, I., Salditt-Georgieff, M., and Darnell, J. E. J. 1987. Persistence of liver-specific messenger RNA in cultured hepatocytes: different regulatory events for different genes. *Journal of Cell Biology* 105: 2877-85.
- ³¹ Donato, M. T., Gomez-Lechon, M. J., Jover, R., Nakamura, T., and Castell, J. V. 1998. Human hepatocyte growth factor down-regulates the expression of cytochrome P450 isozymes in human hepatocytes in primary culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 284: 760-7.
- ³² Donato, M. T., Castell, J. V., and Gomez-Lechon, M. J. 1995. Effect of model inducers on cytochrome P450 activities of human hepatocytes in primary culture. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 23: 553-8.
- ³³ Gomez-Lechon, M. J., Castelli, J., Guillen, I., O'Connor, E., Nakamura, T., Fabra, R., and Trullenque, R. 1995. Effects of hepatocyte growth factor on the growth and metabolism of human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 21: 1248-54.

- ³⁴ Ohno, K., and Maier, P. 1994. Cultured rat hepatocytes adapt their cellular glycolytic activity and adenylate energy status to tissue oxygen tension: influences of extracellular matrix components, insulin and glucagon. *Journal of Cellular Physiology* 160: 358-66.
- ³⁵ Landry, J., Bernier, D., Ouellet, C., Goyette, R., and Marceau, N. 1985. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *Journal of Cell Biology* 101: 914-23.
- ³⁶ Bhatia, S. N., Balis, U. J., Yarmush, M. L., and Toner, M. 1999. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB Journal* 13: 1883-900.
- ³⁷ Maher, J. J. 1988. Primary hepatocyte culture: is it home away from home?. *Hepatology* 8: 1162-6.
- ³⁸ Reid, L. M., and Jefferson, D. M. 1984. Culturing hepatocytes and other differentiated cells. *Hepatology* 4: 548-59.
- ³⁹ Neuhaus, P., Neuhaus, R., Vonnahme, F., and Pichelmayer, R. 1983. Verbesserte Möglichkeiten des temporären Leberersatzes durch ein neues Konzept der extrakorporalen Leberperfusion. in H. Schreiber, editors. *Chirurgisches Forum 83 für experimentelle und klinische Forschung*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- ⁴⁰ Neuhaus, P., and Blumhardt, G. 1993. Extracorporeal liver perfusion: applications of an improved model for experimental studies of the liver. *International Journal of Artificial Organs* 16: 729-39.
- ⁴¹ Schon, M. R., Lemmens, H. P., Neuhaus, P., Baehr, P., Heil, W., Pohlein, C., Thierry, J., and Hammer, C. 1994. Improved xenogeneic extracorporeal liver perfusion. *Transplantation Proceedings* 26: 1293-7.
- ⁴² Pascher, A., Sauer, I. M., Hammer, C., Gerlach, J. C., and Neuhaus, P. 2002. Extracorporeal liver perfusion as hepatic assist in acute liver failure: a review of world experience. *Xenotransplantation* 9: 309-24.
- ⁴³ Arkadopoulos, N., Detry, O., Rozga, J., and Demetriou, A. A. 1998. Liver assist systems: state of the art. *International Journal of Artificial Organs* 21: 781-7.
- ⁴⁴ Nose, Y., Mikami, J., and Kasai, Y. 1963. An experimental artificial liver utilizing extracorporeal metabolism with sliced or granulated canine liver. *ASAIO Transactions* 9: 358-362.
- ⁴⁵ Brunner, G., Holloway, C. J., and Losgen, H. 1979. The application of immobilized enzymes in an artificial liver support system. *Artificial Organs* 3: 27-30.
- ⁴⁶ Soyer, T., Lempinen, M., Walker, J. E., Supanwanid, P., and Eiseman, B. 1973. Extracorporeal assist of anhepatic animals with liver slice perfusion. *American Journal of Surgery* 126: 20-4.
- ⁴⁷ Eiseman, B., Norton, L., and Kralios, N. C. 1976. Hepatocyte perfusion within a centrifuge. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* 142: 21-8.
- ⁴⁸ Uchino, J., Tsuburaya, T., Kumagai, F., Hase, T., Hamada, T., Komai, T., Funatsu, A., Hashimura, E., Nakamura, K., and Kon, T. 1988. A hybrid bioartificial liver composed of multiplated hepatocyte monolayers. *ASAIO Transactions* 34: 972-7.
- ⁴⁹ Sussman, N. L., and Kelly, J. H. 1993. Improved liver function following treatment with an extracorporeal liver assist device. *Artificial Organs* 17: 27-30.
- ⁵⁰ Ellis, A. J., Hughes, R. D., Wendon, J. A., Dunne, J., Langley, P. G., Kelly, J. H., Gislason, G. T., Sussman, N. L., and Williams, R. 1996. Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 24: 1446-51.
- ⁵¹ Stange, J., Mitzner, S., Strauss, M., Fischer, U., Lindemann, S., Peters, E., Holtz, M., Drewelow, B., and Schmidt, R. 1995. Primary or established liver cells for a hybrid liver? Comparison of metabolic features. *ASAIO Journal* 41: M310-5.
- ⁵² Gerlach, J. C., Zeilinger, K., Spatkowski, G., Hentschel, F., Schnoy, N., Kolbeck, S., Schindler, R. K., and Neuhaus, P. 2001. Large-scale isolation of sinusoidal endothelial cells from pig and

human liver. *Journal of Surgical Research* 100: 39-45.

⁵³ Gerlach, J. C. 1994. Use of hepatocyte cultures for liver support bioreactors. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 368: 165-71.

⁵⁴ Chapman, L. E., Folks, T. M., Salomon, D. R., Patterson, A. P., Eggerman, T. E., and Noguchi, P. D. 1995. Xenotransplantation and xenogeneic infections. *New England Journal of Medicine* 333: 1498-501.

⁵⁵ Chapman, L. E., Heneine, W., Switzer, W., Sandstrom, P., and Folks, T. M. 1999. Xenotransplantation: the potential for xenogeneic infections. *Transplantation Proceedings* 31: 909-10.

⁵⁶ Chapman, L. E., and Bloom, E. T. 2001. Clinical xenotransplantation. *JAMA* 285: 2304-6.

⁵⁷ Allan, J. S., Broussard, S. R., Michaels, M. G., Starzl, T. E., Leighton, K. L., Whitehead, E. M., Comuzzie, A. G., Lanford, R. E., Leland, M. M., Switzer, W. M., and Heneine, W. 1998. Amplification of simian retroviral sequences from human recipients of baboon liver transplants. *AIDS Research and Human Retroviruses* 14: 821-4.

⁵⁸ Blusch, J. H., Patience, C., and Martin, U. 2002. Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation* 9: 242-51.

⁵⁹ Dorling, A. 2002. Clinical xenotransplantation: pigs might fly?. *American Journal of Transplantation* 2: 695-700.

⁶⁰ Gerlach, J. C. 1996. Development of a hybrid liver support system: a review. *International Journal of Artificial Organs* 19: 645-54.

⁶¹ Gerlach, J. C., Botsch, M., Kardassis, D., Lemmens, P., Schon, M., Janke, J., Puhl, G., Unger, J., Kraemer, M., Busse, B., Bohmer, C., Belal, R., Ingenlath, M., Kosan, M., Kosan, B., Sultmann, J., Patzold, A., Tietze, S., Rossaint, R., Muller, C., and Monch, 2001. Experimental evaluation of a cell module for hybrid liver support. *International Journal of Artificial Organs* 24: 793-8.

⁶² Sauer, I. M., Kardassis, D., Zeillinger, K., Pascher, A., Gruenwald, A., Pless, G., Irgang, M., Kraemer, M., Puhl, G., Frank, J., Muller, A. R., Steinmuller, T., Denner, J., Neuhaus, P., and Gerlach, J. C. 2003. Clinical extracorporeal hybrid liver support - phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation* 10: 460-469.

⁶³ Joly, A., Desjardins, J. F., Fremond, B., Desille, M., Campion, J. P., Malledant, Y., Lebreton, Y., Semana, G., Edwards-Levy, F., Levy, M. C., and Clement, B. 1997. Survival, proliferation, and functions of porcine hepatocytes encapsulated in coated alginate beads: a step toward a reliable bioartificial liver. *Transplantation* 63: 795-803.

⁶⁴ Zeilinger, K., Sauer, I. M., Pless, G., Strobel, C., Rudzitis, J., Wang, A., Nussler, A. K., Grebe, A., Mao, L., Auth, S. H. G., Unger, J., Neuhaus, P., and Gerlach, J. C. 2002. Three-dimensional co-culture of primary human liver cells in bioreactors for in vitro drug studies: effects of the initial cell quality on the long-term maintenance of hepatocyte-specific functions. *Altern Lab Anim* 30: 525-38.

⁶⁵ Fry, J., and Hammond, A. 1993. Assessment of the functional Integrity of Hepatocytes. .

⁶⁶ Callahan, A. 1967. Viability assay of tissues and organs. *Cryobiology* 4: 137-9.

⁶⁷ Gerlach, J. C., Schnoy, N., Encke, J., Smith, M. D., Muller, C., and Neuhaus, P. 1995. Improved hepatocyte in vitro maintenance in a culture model with woven multicompartiment capillary systems: electron microscopy studies. *Hepatology* 22: 546-52.

⁶⁸ Gerlach, J., Schnoy, N., Smith, M. D., and Neuhaus, P. 1994. Hepatocyte culture between woven capillary networks: a microscopy study. *Artificial Organs* 18: 226-30.

⁶⁹ Sauer, I. M., Zeilinger, K., Obermayer, N., Pless, G., Gruenwald, A., Pascher, A., Mieder, T., Roth, S., Goetz, M., Kardassis, D., Mas, A., Neuhaus, P., and Gerlach, J. C. 2002. Primary human liver cells as source for modular extracorporeal liver support--a preliminary report. *International Journal of Artificial Organs* 25: 1001-5.

⁷⁰ Herman, B., Nieminen, A. L., Gores, G. J., and Lemasters, J. J. 1988. Irreversible injury in anoxic hepatocytes precipitated by an abrupt increase in plasma membrane permeability. *FASEB Journal*

2: 146-51.

⁷¹ Claret, M., and Mazet, J. L. 1972. Ionic fluxes and permeabilities of cell membranes in rat liver. *J Physiol* 223: 279-95.

⁷² Berry, M. N., Gregory, R. B., Grivell, A. R., Henly, D. C., Nobes, C. D., Phillips, J. W., and Wallace, P. G. 1988. Intracellular mitochondrial membrane potential as an indicator of hepatocyte energy metabolism: further evidence for thermodynamic control of metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 936: 294-306.

⁷³ Berry, M., Edwards, A., and Barritt, G. 1991. Assessment of integrity of isolated hepatocytes. Pages 83-98 in M. Berry, A. Edwards, and G. Barritt, editors. *Isolated Hepatocytes*. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.

⁷⁴ Buddecke, E., and Fischer, M. 1992. Enzyme. Pages 76-87 in E. Buddecke, and M. Fischer, editors. *Pathophysiologie, Pathobiochemie, Klinische Chemie*. Walter de Gruyter, Berlin.

⁷⁵ Bircher, J. 1986. Assessment of prognosis in advanced liver disease: to score or to measure, that's the question. *Hepatology* 6: 1036-7.

⁷⁶ Winkler, K., Bass, L., Keiding, S., and Tygstrup, N. 1979. The physiologic basis for clearance measurements in hepatology. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 14: 439-48.

⁷⁷ Nyberg, S. L., Mann, H. J., Remmel, R. P., Hu, W. S., and Cerra, F. B. 1993. Pharmacokinetic analysis verifies P450 function during in vitro and in vivo application of a bioartificial liver. *ASAIO Journal* 39: M252-6.

⁷⁸ Benowitz, N. L., and Meister, W. 1978. Clinical pharmacokinetics of lignocaine. *Clinical Pharmacokinetics* 3: 177-201.

⁷⁹ Keenaghan, J. B., and Boyes, R. N. 1972. The tissue distribution, metabolism and excretion of lidocaine in rats, guinea pigs, dogs and man. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 180: 454-63.

⁸⁰ Bargetzi, M. J., Aoyama, T., Gonzalez, F. J., and Meyer, U. A. 1989. Lidocaine metabolism in human liver microsomes by cytochrome P450III A4. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 46: 521-7.

⁸¹ Gawronska-Szklarz, B., Musial, D. H., Pawlik, A., and Paprota, B. 2003. Effect of experimental diabetes on pharmacokinetic parameters of lidocaine and MEGX in rats. *Polish Journal of Pharmacology* 55: 619-24.

⁸² Mets, B., Hickman, R., and Chalton, D. 1994. Lidocaine extraction by the in vivo and isolated perfused pig liver. *Journal of Hepatology* 21: 1067-74.

⁸³ Winkler, K., Henriksen, J. H., and Tygstrup, N. 1993. Hepatic, renal, and total body galactose elimination in the pig. *American Journal of Physiology* 265: G9-14.

⁸⁴ Löffler, G., and Petrides, P. 1988. Intermediärstoffwechsel II: Kohlenhydrate. Pages 349-390 in G. Löffler, and P. Petrides, editors. *Physiologische Chemie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

⁸⁵ Keiding, S., Johansen, S., Winkler, K., Tonnesen, K., and Tygstrup, N. 1976. Michaelis-Menten kinetics of galactose elimination by the isolated perfused pig liver. *American Journal of Physiology* 230: 1302-13.

⁸⁶ Keiding, S., Johansen, S., and Winkler, K. 1982. Hepatic galactose elimination kinetics in the intact pig. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 42: 253-9.

⁸⁷ Köttgen, E., and Tauber, R. 1995. Klinisch-chemische Untersuchungen. Pages 125-145 in W. Gerok, and H. Blum, editors. *Hepatologie*. Urban & Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore.

⁸⁸ Bircher, J. 1983. Quantitative assessment of deranged hepatic function: a missed opportunity?. *Seminars in Liver Disease* 3: 275-84.

⁸⁹ Shreeve, W. W., Shoop, J. D., Ott, D. G., and McInteer, B. B. 1976. Test for alcoholic cirrhosis by conversion of [¹⁴C]- or [¹³C]galactose to expired CO₂. *Gastroenterology* 71: 98-101.

- ⁹⁰ Zeeh, J., Lange, H., Bosch, J., Pohl, S., Loesgen, H., Eggers, R., Navasa, M., Chesta, J., and Bircher, J. 1988. Steady-state extrarenal sorbitol clearance as a measure of hepatic plasma flow. *Gastroenterology* 95: 749-59.
- ⁹¹ Molino, G., Cavanna, A., Avagnina, P., Ballare, M., and Torchio, M. 1987. Hepatic clearance of D-sorbitol. Noninvasive test for evaluating functional liver plasma flow. *Digestive Diseases and Sciences* 32: 753-8.
- ⁹² Molino, G., Avagnina, P., Cavanna, A., Ballare, M., Torchio, M., Bona, B., and Belforte, G. 1986. Sorbitol clearance: a parameter reflecting liver plasma flow in the rat. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 52: 119-32.
- ⁹³ Andreassen, P. B., Ranek, L., Statland, B. E., and Tygstrup, N. 1974. Clearance of antipyrine-dependence of quantitative liver function. *European Journal of Clinical Investigation* 4: 129-34.
- ⁹⁴ Dossing, M., Poulsen, H. E., Andreassen, P. B., and Tygstrup, N. 1982. A simple method for determination of antipyrine clearance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 32: 392-6.
- ⁹⁵ Engel, G., Hofmann, U., Heidemann, H., Cosme, J., and Eichelbaum, M. 1996. Antipyrine as a probe for human oxidative drug metabolism: identification of the cytochrome P450 enzymes catalyzing 4-hydroxyantipyrine, 3-hydroxymethylantipyrine, and norantipyrine formation. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 59: 613-23.
- ⁹⁶ Gross, J. B. J., Reichen, J., Zeltner, T. B., and Zimmermann, A. 1987. The evolution of changes in quantitative liver function tests in a rat model of biliary cirrhosis: correlation with morphometric measurement of hepatocyte mass. *Hepatology* 7: 457-63.
- ⁹⁷ Löffler, G., and Petrides, P. 1988. Intermediärstoffwechsel IV: Aminosäuren. in G. Löffler, and P. Petrides, editors. *Physiologische Chemie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- ⁹⁸ Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. 2000. *Lehninger principles of biochemistry*. Worth Publishers, New York.
- ⁹⁹ Castell, D. O. 1965. The ammonia tolerance test: an index of portal hypertension. *Gastroenterology* 49: 539-43.
- ¹⁰⁰ Felding, C., Christensen, R. F., and Lindahl, F. 1984. Ammonia tolerance test used to differentiate between ascites of cirrhotic and malignant genesis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 19: 365-8.
- ¹⁰¹ Berry, M., Edwards, A., and Barritt, G. (1991. *Metabolic Activities - Ureogenesis*. Pages 170-171 in M. Berry, A. Edwards, and G. Barritt, editors. *Isolated Hepatocytes*. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
- ¹⁰² Fuchs, M., Gerlach, J., Unger, J., Encke, J., Smith, M., Neuhaus, P., Nundel, M., and Riedel, E. 1994. Alpha-keto acid metabolism by hepatocytes cultured in a hybrid liver support bioreactor. *International Journal of Artificial Organs* 17: 554-8.
- ¹⁰³ Fuchs, M., Gerlach, J., Encke, J., Unger, J., Smith, M., Neuhaus, P., and Riedel, E. 1994. Amino acid metabolism by hepatocytes in a hybrid liver support bioreactor. *International Journal of Artificial Organs* 17: 663-9.
- ¹⁰⁴ Sielaff, T. D., Hu, M. Y., Rao, S., Groehler, K., Olson, D., Mann, H. J., Rummel, R. P., Shatford, R. A., Amiot, B., and Hu, W. S. 1995. A technique for porcine hepatocyte harvest and description of differentiated metabolic functions in static culture. *Transplantation* 59: 1459-63.
- ¹⁰⁵ Jeejeebhoy, K. N., Phillips, M. J., Ho, J., and Bruce-Robertson, A. 1980. Ultrastructural and functional studies of cultured adult rat hepatocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 349: 18-27.
- ¹⁰⁶ Berry, M. N. 1974. High-yield preparation of morphologically intact isolated parenchymal cells from rat liver. *Methods in Enzymology* 32: 625-32.
- ¹⁰⁷ Gerlach, J., Brombacher, J., Smith, M., and Neuhaus, P. 1996. High yield hepatocyte isolation from pig livers for investigation of hybrid liver support systems: influence of collagenase concentration and body weight. *Journal of Surgical Research* 62: 85-9.

- ¹⁰⁸ Gerlach, J., Kloppel, K., Schauwecker, H. H., Tauber, R., Muller, C., and Bucherl, E. S. 1989. Use of hepatocytes in adhesion and suspension cultures for liver support bioreactors. *International Journal of Artificial Organs* 12: 788-92.
- ¹⁰⁹ Bergmeyer, H. G. M. & W. H. 1983. Galactose Dehydrogenase. 2: 193-194.
- ¹¹⁰ Bergmeyer, H. G. M. & W. H. 1983. Sorbitol Dehydrogenase. Pages 309-310 in H. Bergmeyer, editors. *Methods of Enzymatic Analysis*. VCH, Weinheim, Germany - Deerfield Beach, FL, USA.
- ¹¹¹ Brosius, F. 2002. SPSS 11. mitp Verlag, Bonn.
- ¹¹² Pallant, J. 2001. SPSS Survival Manual. Open University Press, Buckingham, Philadelphia.
- ¹¹³ Harten, H., Nägerl, H., and Schulte, H. 1993. *Statistik für Mediziner*. Chapman & Hall, London, New York.
- ¹¹⁴ Eric Weisstein 2004. Eric Weisstein's World of Mathematics. <http://mathworld.wolfram.com>.
- ¹¹⁵ Schutz, E., Shipkova, M., Niedmann, P. D., Wieland, E., Armstrong, V. W., and Oellerich, M. 1998. Determination of monoethylglycinexylidide by fluorescence polarization immunoassay in highly icteric serum samples: modified precipitation procedure and HPLC compared. *Clinical Chemistry* 44: 1269-74.
- ¹¹⁶ Zeilinger, K., Tonnelier, B., Tschesche, A., Nehls, W., Spatkowski, G., Schindler, R., Riedel, E., Gerlach, Y. C., and Neuhaus, P. 1997. Effect of energy substrates on the preservation outcome of hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in an experimental hypoxia/reoxygenation model. *Transplantation Proceedings* 29: 403-5.
- ¹¹⁷ Obermayer, N., Busse, B., Grunwald, A., Monch, E., Muller, C., Neuhaus, P., and Gerlach, J. C. 2001. Biochemical characterization of bioreactors for hybrid liver support: serum-free liver cell coculture of nonparenchymal and parenchymal cells. *Transplantation Proceedings* 33: 1930-1.
- ¹¹⁸ Meyer-Wyss, B., Renner, E., Luo, H., and Scholer, A. 1993. Assessment of lidocaine metabolite formation in comparison with other quantitative liver function tests. *Journal of Hepatology* 19: 133-9.
- ¹¹⁹ Farrell, G. C., Cooksley, W. G., and Powell, L. W. 1979. Drug metabolism in liver disease: activity of hepatic microsomal metabolizing enzymes. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 26: 483-92.
- ¹²⁰ Meyer, B., Luo, H. S., Bargetzi, M., Renner, E. L., and Stalder, G. A. 1991. Quantitation of intrinsic drug-metabolizing capacity in human liver biopsy specimens: support for the intact-hepatocyte theory. *Hepatology* 13: 475-81.
- ¹²¹ Saad, B., Thomas, H., Schawalder, H., Waechter, F., and Maier, P. 1994. Oxygen tension, insulin, and glucagon affect the preservation and induction of cytochrome P450 isoforms in cultured rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 126: 372-9.
- ¹²² Le Couteur, D. G., and McLean, A. J. 1998. The aging liver. Drug clearance and an oxygen diffusion barrier hypothesis. *Clinical Pharmacokinetics* 34: 359-73.
- ¹²³ Jauregui, H. O., Mullon, C. J., Trenkler, D., Naik, S., Santangini, H., Press, P., Muller, T. E., and Solomon, B. A. 1995. In vivo evaluation of a hollow fiber liver assist device. *Hepatology* 21: 460-9.
- ¹²⁴ Lamesch, P., Ringe, B., Oellerich, M., Burdelski, M., Beyrau, R., Gubernatis, G., and Pichlmayr, R. 1990. Assessment of liver function in the early postoperative period after liver transplantation with ICG, MEGX, and GAL tests. *Transplantation Proceedings* 22: 1539-41.
- ¹²⁵ Schroeder, T. J., Gremse, D. A., Mansour, M. E., Theuerling, A. W., Brunson, M. E., Ryckman, F. C., Suchy, F. J., Penn, I., Alexander, J. W., and Pesce, A. J. 1989. Lidocaine metabolism as an index of liver function in hepatic transplant donors and recipients. *Transplantation Proceedings* 21: 2299-301.
- ¹²⁶ Burdelski, M., Oellerich, M., Lamesch, P., Raude, E., Ringe, B., Neuhaus, P., Bortfeld, S., Kammerling, C., Raith, H., and Scheruhn, M. 1987. Evaluation of quantitative liver function tests in liver donors. *Transplantation Proceedings* 19: 3838-9.

- ¹²⁷ Burdelski, M., Oellerich, M., Bornscheuer, A., Luebke, N., Ringe, B., Lamesch, P., Raude, E., Raith, H., Scheruhn, M., and Gubernatis, G. 1989. Donor rating in human liver transplantation: correlation of oxygen consumption after revascularization with MEGX formation in donors. *Transplantation Proceedings* 21: 2392-3.
- ¹²⁸ Oellerich, M., Raude, E., Burdelski, M., Schulz, M., Schmidt, F. W., Ringe, B., Lamesch, P., Pichlmayr, R., Raith, H., and Scheruhn, M. 1987. Monoethylglycinexylidide formation kinetics: a novel approach to assessment of liver function. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 25: 845-53.
- ¹²⁹ Oellerich, M., Burdelski, M., Ringe, B., Lamesch, P., Gubernatis, G., Bunzendahl, H., Pichlmayr, R., and Herrmann, H. 1989. Lignocaine metabolite formation as a measure of pre-transplant liver function. *Lancet* 1: 640-2.
- ¹³⁰ Ercolani, G., Grazi, G. L., Calliva, R., Pierangeli, F., Cescon, M., Cavallari, A., and Mazziotti, A. 2000. The lidocaine (MEGX) test as an index of hepatic function: its clinical usefulness in liver surgery. *Surgery* 127: 464-71.
- ¹³¹ Shiffman, M. L., Luketic, V. A., Sanyal, A. J., Duckworth, P. F., Purdum, P. P. 3., Contos, M. J., Mills, A. S., Edinboro, L. E., and Poklis, A. 1994. Hepatic lidocaine metabolism and liver histology in patients with chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 19: 933-40.
- ¹³² Fabbri, A., Bianchi, G. P., and Marchesini, G. 1995. Hepatic lidocaine metabolism and liver histology. *Hepatology* 21: 1761-2.
- ¹³³ Huang, Y. S., Lee, S. D., Deng, J. F., Wu, J. C., Lu, R. H., Lin, Y. F., Wang, Y. J., and Lo, K. J. 1993. Measuring lidocaine metabolite--monoethylglycinexylidide as a quantitative index of hepatic function in adults with chronic hepatitis and cirrhosis. *Journal of Hepatology* 19: 140-7.
- ¹³⁴ Molino, G., Avagnina, P., Belforte, G., and Bircher, J. 1998. Assessment of the hepatic circulation in humans: new concepts based on evidence derived from a D-sorbitol clearance method. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 131: 393-405.
- ¹³⁵ Bradley, S., Ingelfinger, F., Bradley, G., and Curry, J. 1945. The estimation of hepatic blood flow in man. *The Journal of Clinical Investigation* 24: 890-897.
- ¹³⁶ Bradley, S. 1962. The hepatic circulation. Pages 1387-1438 in e. American Physiologic Society, editors. *Handbook of Physiology: Circulation*. American Physiologic Society, Washington, DC.
- ¹³⁷ Salganik, R. I., and Solov'eva, N. A. 1972. Induction of galactose-1-phosphate uridylyltransferase in rat liver by galactose and experimental galactosemia. *Voprosy Meditsinskoi Khimii* 18: 472-7.
- ¹³⁸ Keiding, S., Andreasen, P. B., and Fauerholdt, L. 1973. Effect of phenobarbital induction on galactose elimination capacity in the rat. *Biochemical Pharmacology* 22: 2293-7.
- ¹³⁹ Keiding, S., Johansen, S., and Tonnesen, K. 1977. Kinetics of ethanol inhibition of galactose elimination in perfused pig liver. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 37: 487-94.
- ¹⁴⁰ Bircher, J., and Colombo, J. P. 1978. Liver tests and tests of liver function. *Therapeutische Umschau* 35: 701-6.
- ¹⁴¹ Winkel, P., Ramsoe, K., Lyngbye, J., and Tygstrup, N. 1975. Diagnostic value of routine liver tests. *Clinical Chemistry* 21: 71-5.
- ¹⁴² Fabbri, A., Bianchi, G., Motta, E., Brizi, M., Zoli, M., and Marchesini, G. 1996. The galactose elimination capacity test: a study of the technique based on the analysis of 868 measurements. *American Journal of Gastroenterology* 91: 991-6.
- ¹⁴³ Fabbri, A., Bianchi, G., Brizi, M., Zoli, M., and Marchesini, G. 1997. Uncertainty in liver function assessment on the basis of single-point galactose concentration. *Digestion* 58: 379-83.
- ¹⁴⁴ De Bartolo, L., Jarosch-Von Schweder, G., Haverich, A., and Bader, A. 2000. A novel full-scale flat membrane bioreactor utilizing porcine hepatocytes: cell viability and tissue-specific functions. *Biotechnology Progress* 16: 102-8.

- ¹⁴⁵ Mundt, A., Puhl, G., Muller, A., Sauer, I., Muller, C., Richard, R., Fotopoulou, C., Doll, R., Gabelein, G., Hohn, W., Hofbauer, R., Neuhaus, P., and Gerlach, J. 2002. A method to assess biochemical activity of liver cells during clinical application of extracorporeal hybrid liver support. *International Journal of Artificial Organs* 25: 542-8.
- ¹⁴⁶ Sestoft, L., and Marshall, M. O. 1988. Regulation of lactate uptake and lactate production in liver from 48-h-starved rats: effects of pH, flow and glucose concentration. *Clin Sci (Lond)* 74: 403-6.
- ¹⁴⁷ Sestoft, L., Bartels, P. D., and Folke, M. 1982. Pathophysiology of metabolic acidosis: effect of low pH on the hepatic uptake of lactate, pyruvate and alanine. *Clinical Physiology* 2: 51-8.
- ¹⁴⁸ Munoz, A. E., Miguez, C., Rubio, M., Bartellini, M., Levi, D., Podesta, A., Niselman, V., and Terg, R. 1999. Lidocaine and monoethylglycinexylidide serum determinations to analyze liver function of cirrhotic patients after oral administration. *Digestive Diseases and Sciences* 44: 789-95.
- ¹⁴⁹ Vessey, D. 1996. Metabolism of Xenobiotics by the Human Liver. Pages 257-306 in D. Zakim, and T. Boyer, editors. *Hepatology - A textbook of Liver Disease*. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- ¹⁵⁰ Larrey, D., and Branch, R. A. 1983. Clearance by the liver: current concepts in understanding the hepatic disposition of drugs. *Seminars in Liver Disease* 3: 285-97.
- ¹⁵¹ Winkler, K., Keiding, S., Tonnesen, K., and Tygstrup, N. 1986. Effect of short lasting hypoxia on the metabolic function of the perfused pig liver. Comparison of ischaemic and hypoxaemic hypoxia. *European Journal of Clinical Investigation* 16: 106-12.
- ¹⁵² Kardassis, D., Busse, B., Besseling, A., Kraemer, M., Puhl, G., Spatkowski, G., Holland, G., Schnoy, N., Mueller, C., Neuhaus, P., and Gerlach, J. 1999. Enzyme release in hybrid liver support systems: marker for quality prior to clinical application. *Transplantation Proceedings* 31: 668-9.
- ¹⁵³ Bader, A., De Bartolo, L., and Haverich, A. 2000. High level benzodiazepine and ammonia clearance by flat membrane bioreactors with porcine liver cells. *Journal of Biotechnology* 81: 95-105.
- ¹⁵⁴ Pan, J., Naik, S., Santangini, H., Trenkler, D., and Jauregui, H. 1996. Flow cytometric characterization of isolated porcine hepatocyte suspensions for liver support. *Artificial Organs* 20: 1173-80.
- ¹⁵⁵ De Bartolo, L., and Bader, A. 2002. Flat membrane bioreactor for the replacement of liver functions. *Ernst Schering Res Found Workshop* 89-104.
- ¹⁵⁶ Rosenberg, E., Faris, R. A., Spray, D. C., Monfils, B., Abreu, S., Danishefsky, I., and Reid, L. M. 1996. Correlation of expression of connexin mRNA isoforms with degree of cellular differentiation. *Cell Adhesion and Communication* 4: 223-35.
- ¹⁵⁷ Riordan, S. M., Skouteris, G. G., and Williams, R. 1998. Metabolic activity and clinical efficacy of animal and human hepatocytes in bioartificial support systems for acute liver failure. *International Journal of Artificial Organs* 21: 312-8.
- ¹⁵⁸ Su, A. I., Guidotti, L. G., Pezacki, J. P., Chisari, F. V., and Schultz, P. G. 2002. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 11181-6.
- ¹⁵⁹ Browne, T. R. 1990. Stable isotopes in clinical pharmacokinetic investigations. Advantages and disadvantages. *Clinical Pharmacokinetics* 18: 423-33.
- ¹⁶⁰ Ontell, S. J., Makowka, L., Trager, J., Mazzaferro, V., Ove, P., and Starzl, T. E. 1989. Pharmacologic modulation of experimental postischemic hepatic function. *Annals of Surgery* 209: 200-10.
- ¹⁶¹ Maganto, P., Cienfuegos, J. A., Santamaria, L., Eroles, G., Andres, S., Castillo-Olivares, J. L., and Municio, A. M. 1988. Cryopreservation and transplantation of hepatocytes: an approach for culture and clinical application. *Cryobiology* 25: 311-22.
- ¹⁶² Maganto, P., Cienfuegos, J. A., Santamaria, L., Rodriguez, V., Eroles, G., Andres, S., Castillo-Olivares, J. L., and Municio, A. M. 1990. Auxiliary liver by transplanted frozen-thawed hepatocytes.

Journal of Surgical Research 48: 24-32.

¹⁶³ Maganto, P., Cienfuegos, J. A., Santamaria, L., Eroles, G., Andres, S., Pardo, F., Castillo-Olivares, J. L., and Municio, A. M. 1990. Transplanted frozen-thawed hepatocytes as a therapeutic approach in liver disease. Transplantation Proceedings 22: 2017-9.

¹⁶⁴ Gerlach, J. C., Zeilinger, K., Sauer, I. M., Mieder, T., Naumann, G., Grunwald, A., Pless, G., Holland, G., Mas, A., Vienken, J., and Neuhaus, P. 2002. Extracorporeal liver support: porcine or human cell based systems?. International Journal of Artificial Organs 25: 1013-8.

¹⁶⁵ Gerlach, J. C., and Zeilinger, K. 2002. Adult stem cell technology--prospects for cell based therapy in regenerative medicine. International Journal of Artificial Organs 25: 83-90.

¹⁶⁶ Squinto, S. P. 1997. Genetically modified animal organs for human transplantation. World Journal of Surgery 21: 939-42.

Danksagung und Widmung

Herr Prof. Dr. Peter Neuhaus und Herr Prof. Dr. Dr. Jörg Gerlach danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und deren Begutachtung.

Mein besonderer Dank gilt Herr Prof. Dr. Dr. Jörg Gerlach für die Vergabe des Themas, die Forschungsmöglichkeiten in der Charité und bei der Hybrid-Organ GmbH, sowie für seine Unterstützung und vielfachen Anregungen während der Entstehung dieser Arbeit.

Meinen Kollegen in der Charité und bei der Hybrid-Organ GmbH möchte ich für die freundliche Unterstützung, die weit über die Laborarbeit hinausging, und für die gute Arbeitsatmosphäre danken. Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. Katrin Zeilinger und Dr. Igor Sauer für die vielen Anregungen, die Korrekturarbeit und das konstante Motivieren beim Zusammenschreiben der vorliegenden Dissertation.

Bei allen Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie und Chirurgischen Klinik bedanke ich mich für die freundschaftliche Atmosphäre und das Einarbeiten in eine Vielzahl von Methoden.

Bei den Mitarbeitern des Zentrallabors, insbesondere Dr. Christian Müller und Frau Renate Moritz, möchte ich mich für die Kooperation in der Analytik bedanken.

Für die Unterstützung und Beratung bei der Statistik gilt mein Dank meinem Kollegen Ingo Steffen, der mir bereits wegen seiner ehrenamtlichen Tätigkeit im Cipom bekannt war.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mir über den gesamten Zeitraum der Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Eltern, deren Vertrauen und Unterstützung mir Studium und Promotion erst ermöglichten. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit (einschließlich Abbildungen), die anderen Ursprungs sind in jedem Einzelfall mit Angabe des Urhebers als solche kenntlich gemacht habe.

Des weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht ist sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin vom 12. Dezember 2000 ist mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation wurde von Prof. Dr. med. Peter Neuhaus, PD Dr. med. Jörg Gerlach aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie am Campus Virchow-Klinikum betreut.

Die Promotion wurde mit Fördermitteln der DFG und der Europäischen Union durchgeführt.